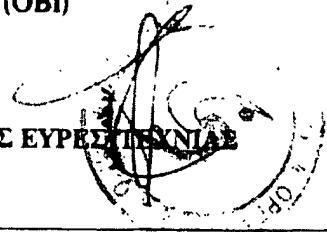




ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ (ΟΒΙ)

ΑΙΤΗΣΗ

ΓΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣ ΤΕΧΝΙΑΣ



1. Αποστολή ταυτότητας από την Ευρωπαϊκή Διπλωματία	980402483
2. Ημερομηνία ταυτότητας:	22.10.1998
3. Ημερομηνία καταθέσης της μεταφράσης Ευρωπαϊκού Διπλωματος	
4. Αριθμός δημοσίευσης: Ε.Δ.Β.Ι:	

5. Αριθμός / ημερομηνία καταθέσης Ευρωπαϊκής αίτησης: 91916986.2 - 13.09.91
6. Αριθμός / ημερομηνία δημοσίευσης χωρίγητης Ευρωπαϊκού Διπλώματος: 0548228 - 12.08.98

<input checked="" type="checkbox"/> Μετάφραση Ευρωπαϊκού Διπλώματος	<input type="checkbox"/> Μετάφραση τροποποιημένου Ευρωπαϊκού Διπλώματος
---	---

7. ΔΙΕΘΝΗΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ:	Χώρες προσδιοισμού																				
C12N 9/20	<table> <tr> <td>AT <input checked="" type="checkbox"/> Αυστρία</td> <td>ES <input checked="" type="checkbox"/> Ισπανία</td> <td>IE <input type="checkbox"/> Ιρλανδία</td> <td>PT <input type="checkbox"/> Πορτογαλία</td> </tr> <tr> <td>BE <input checked="" type="checkbox"/> Βελγίο</td> <td>FR <input checked="" type="checkbox"/> Γαλλία</td> <td>IT <input checked="" type="checkbox"/> Ιταλία</td> <td>SE <input checked="" type="checkbox"/> Σουηδία</td> </tr> <tr> <td>LI-CH <input checked="" type="checkbox"/> Ελβετία Λιχτενστάιν</td> <td>FL <input type="checkbox"/> Φλανδία</td> <td>LU <input checked="" type="checkbox"/> Λουξεμβούργο</td> <td></td> </tr> <tr> <td>DE <input checked="" type="checkbox"/> Γερμανία</td> <td>GB <input checked="" type="checkbox"/> Μ. Βρετανία</td> <td>MC <input type="checkbox"/> Μονακό</td> <td></td> </tr> <tr> <td>DK <input checked="" type="checkbox"/> Δανία</td> <td>GR <input checked="" type="checkbox"/> Ελλάδα</td> <td>NL <input checked="" type="checkbox"/> Ολλανδία</td> <td></td> </tr> </table>	AT <input checked="" type="checkbox"/> Αυστρία	ES <input checked="" type="checkbox"/> Ισπανία	IE <input type="checkbox"/> Ιρλανδία	PT <input type="checkbox"/> Πορτογαλία	BE <input checked="" type="checkbox"/> Βελγίο	FR <input checked="" type="checkbox"/> Γαλλία	IT <input checked="" type="checkbox"/> Ιταλία	SE <input checked="" type="checkbox"/> Σουηδία	LI-CH <input checked="" type="checkbox"/> Ελβετία Λιχτενστάιν	FL <input type="checkbox"/> Φλανδία	LU <input checked="" type="checkbox"/> Λουξεμβούργο		DE <input checked="" type="checkbox"/> Γερμανία	GB <input checked="" type="checkbox"/> Μ. Βρετανία	MC <input type="checkbox"/> Μονακό		DK <input checked="" type="checkbox"/> Δανία	GR <input checked="" type="checkbox"/> Ελλάδα	NL <input checked="" type="checkbox"/> Ολλανδία	
AT <input checked="" type="checkbox"/> Αυστρία	ES <input checked="" type="checkbox"/> Ισπανία	IE <input type="checkbox"/> Ιρλανδία	PT <input type="checkbox"/> Πορτογαλία																		
BE <input checked="" type="checkbox"/> Βελγίο	FR <input checked="" type="checkbox"/> Γαλλία	IT <input checked="" type="checkbox"/> Ιταλία	SE <input checked="" type="checkbox"/> Σουηδία																		
LI-CH <input checked="" type="checkbox"/> Ελβετία Λιχτενστάιν	FL <input type="checkbox"/> Φλανδία	LU <input checked="" type="checkbox"/> Λουξεμβούργο																			
DE <input checked="" type="checkbox"/> Γερμανία	GB <input checked="" type="checkbox"/> Μ. Βρετανία	MC <input type="checkbox"/> Μονακό																			
DK <input checked="" type="checkbox"/> Δανία	GR <input checked="" type="checkbox"/> Ελλάδα	NL <input checked="" type="checkbox"/> Ολλανδία																			

8. ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΛΙΠΑΣΗΣ. ΤΙΤΛΟΣ

9. ΚΑΤΑΘΕΤΗΣ NOVO NORDISK A/S	10. Τηλέφωνο:	11. Τέλεφαξ:
Όνομα / Επωνυμία: NOVO ALLE, 2880 BAGSVAERD, ΔΑΝΙΑ		
Διεύθυνση / Έδρα:		

<input type="checkbox"/> Επιτέλεον καταθέτες σε πρόσθετο φύλλο χαρτού (Αριθμος)
--

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ (ΕΣ)

Όνομα: **SVENDSEN, ALLAN**

Διεύθυνση: **BAKKELEDET 28, DK-3460 BIRKEROD, ΔΑΝΙΑ**

Τηλέφωνο:

Τέλεφαξ:

[03] Επιπλέον εφευρέτες σε πρόσθετο φύλλο χαρτιού

(Αριθμοί)

ΔΗΛΩΣΗ ΠΡΟΤΕΡΑΙΟΤΗΤΑΣ (αριθμός - ημερομηνία - χώρα προέλευσης)

219490 - 13.09.90 - ΔΑΝΙΑ
219590 - 13.09.90 - ΔΑΝΙΑ
219690 - 13.09.90 - ΔΑΝΙΑ

ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΣ

Όνομα:

ΘΕΟΔΩΡΑ ΒΑΓΕΝΑ

Διεύθυνση: **Κουμπάρη 2, 106 74 Αθήνα**

Τηλέφωνο:

3625757 - 3626624 - 3622724

Τέλεφαξ:

3626742

ΑΝΤΙΚΛΗΤΟΣ

Όνομα:

ΕΛΕΝΗ Γ. ΠΑΠΑΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

Διεύθυνση:

Κουμπάρη 2, 106 74 Αθήνα

Τηλέφωνο:

3625757 - 3626624 - 3622724

3626742

Τόπος: **Αθήνα**

Υπογραφή (ές) του (των) καταθέτη (τών) **ΒΑΓΕΝΑ ΕΛΕΝΗ ΘΕΟΔΩΡΑ**

Ημερομηνία: **21.10.98**

**ΔΙΚΗΓΟΡΙΕΣ Α.Π. 19608
ΚΟΥΜΠΑΡΗ 2 Α. Ν. ΚΑ
ΤΗΛ: 3625757 - 3626624
ΑΦΜ: 34981583
ΔΟΥ: ΒΥΡΩΝΑ**

ΘΕΟΔΩΡΑ ΒΑΓΕΝΑ

ΠΑΡΑΚΑΛΟΥΜΕ ΝΑ ΛΑΚΤΥΛΟΓΡΑΦΗΣΕΤΕ ΤΟ ΌΝΟΜΑ ΚΑΤΩ ΛΠΟΤΗΝ ΥΠΟΓΡΑΦΗΣ
ΣΕ ΗΠΡΗΓΩΣΗ ΝΟΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΝ Ν ΛΑΚΤΥΛΟΓΡΑΦΗΘΕΙ ΚΑΙ Η ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ
ΥΠΟΓΡΑΦΟΝΤΟΣ ΕΙΔΗΣ ΕΙΡΕΙΑ



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ (ΟΒΙ)

E

ΑΙΤΗΣΗ

ΓΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (έντυπο για επιπλέον εφευρέτες)

ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΕΦΕΥΡΕΤΩΝ

Αριθμός επιπλέον για καταθεση ηετιεργασης Ευρωπαϊκού Διπλώματος:	980402483	01
Ημερομηνία παραλαβής:	22.10.1998	
Ημερομηνία καταθεσης της μεταφράσης Ευρωπαϊκού Διπλώματος:		
Λοιπούς δημοσιευσης / Ε.Δ.Β.Ι:		

Αριθμός / ημερομηνία κατάθεσης Ευρωπαϊκής αίτησης: 91916986.2 -13.09.91	02
Αριθμός / ημερομηνία δημοσίευσης χορήγησης Ευρωπαϊκού Διπλώματος: 0548228 -12.08.98	

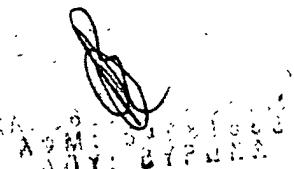
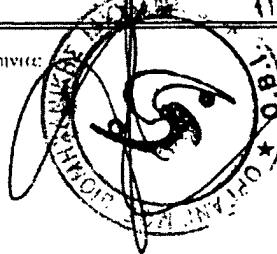
ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ:	08
Όνομα / Επωνυμία: CLAUSEN, IB, GROTH	
Διεύθυνση / Έδρα: ORDRUP JAGTVEJ 153, ST.TV., DK-2920 CHARLOTTENLUND, ΔΑΝΙΑ	
Τηλέφωνο:	Τέλεφαξ:

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ:	08
Όνομα / Επωνυμία: PATKAR, SHAMKANT, ANANT	
Διεύθυνση / Έδρα: CHRISTOFFERS ALLE 91, DK-2800 LYNGBY, ΔΑΝΙΑ	
Τηλέφωνο:	Τέλεφαξ:

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ:	08
Όνομα / Επωνυμία: GORMSEN, ERIK	
Διεύθυνση / Έδρα: SNEKKETOFTEN 15, DK-2830 VIRUM, ΔΑΝΙΑ	
Τηλέφωνο:	Τέλεφαξ:

<input type="checkbox"/> Επιπλέον καταθέτες σε πρόσθιτο φύλλο χαρτιού	09
(Αριθμός)	

ΑΠΟΔΕΙΞΗ
ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΕΓΓΡΑΦΩΝ

ΔΙΚΑΙΟΥΧΟΣ ΤΗ ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΣ		Ημερομηνία:	07/09/2010
 Α.Σ.Μ.: 012345678 Η.Υ.: 0720113		 Υπογειακή επιτημηση σφραγίδα	
Αριθμος αποτελεσματικης μεταφρασης: Εγραφησες Διπλωματος: 980402483 Ημερομηνια παραλαβης: Ημερομηνια καταθεσης της μεταφρασης: Εγραφησες Διπλωματος: Αριθμος δημοσιευσης: ΕΔΒΙ:			

Πιστοποιεί την παραλαβή των εγγράφων έτοις όπως δηλώνονται παρακάτω:

Η ΑΙΤΗΣΗ ΟΠΟΣ ΚΑΤΑΤΙΘΕΤΑΙ ΣΥΝΟΔΕΥΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΕΓΓΡΑΦΑ:

1. Μετάφραση της Περιγραφής 2 αντίγραφα 24 φύλλα ανά αντίγραφο

1a. Ξενόγλωσση Περιγραφή στα: Αγγλικά. Γαλλικά. Γερμανικά - αντίγραφα. 21 φύλλα ανά αντίγραφο

2. Μετάφραση των Αξιώσεων: 2 αντίγραφα 2 φύλλα ανά αντίγραφο

2a. Ξενόγλωσσες Αξιώσεις στα: Αγγλικά. Γαλλικά. Γερμανικά - αντίγραφα. 2 φύλλα ανά αντίγραφο

3. Μετάφραση της Περιληψης: 2 αντίγραφα 2 φύλλα ανά αντίγραφο

3a. Ξενόγλωσση Περιληψη στα: Αγγλικά. Γαλλικά. Γερμανικά - αντίγραφα. 2 φύλλα ανά αντίγραφο

4. Σχέδια: 2 αντίγραφα 9 φύλλα. 9 σύνολο σχεδίων

4a. Ξενόγλωσσα σχέδια: αντίγραφα. 9 φύλλα. 9 σύνολο σχεδίων

5. Διαφορετικές αξιώσεις για την Ελλάδα

6. Απόδειξη καταβολής τελούς κατάθεσης

7. Ειδικό πληρεξούσιο

8. Γενικό Πληρεξούσιο με/χωρίς μετάφραση

9. Επιτέλεον φύλλο (α) καταθέτη (ών)

10. Επιτέλεον φύλλο (α) εφευρέτη (ών)

11. Έντυπο A₁ ή A₂ ή A₃

12. Έντυπο B₁ ή B₂

13. Έντυπο 2006

14. EPO FORM 1219 ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΜΕ ΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠ. Δ.Ε.

EP.15153

ΤΙΤΛΟΣ

5

Παραλλαγές λιπάσης

Πεδίο της εφεύρεσης

Η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται σε νέες παραλλαγές ενζύμιου λιπάσης με βελτιωμένες ιδιότητες, σε DNA και τασκευές που κωδικοποιούν την έκφραση των ρηθέντων παραλλαγών, σε τα κύτταρα ξενιστές ικανά να εκφράζουν τις ποικιλίες από τις DNA κατασκευές, όπως επίσης και σε μια μέθοδο παραγωγής των παραλλαγών μέσω της καλλιέργειας των ρηθέντων ξενιστών κυττάρων.

Ιστορικό της εφεύρεσης

15 Η έλευση και η ανάπτυξη των τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA είχε βαθιά επίδυναση στο πεδίο της χημείας των πρωτεΐνων. Θεωρείται ότι αυτές οι τεχνικές θα καταστήσουν δυνατό το σχεδιασμό πεπτιδών και πρωτεΐνων, όπως τα ένζυμα, σύμφωνα με ειδικά κριτήρια, επιτρέποντας έτσι την παραγωγή ενώπιον με επιθυμητές ιδιότητες.

16 Αόγια της διαθεσιμότητας τέτοιων τεχνικών, έχει καταπούσι άνωντη η κατασκευή ενζύμων με επιθυμητές αλληλουχίες αμινοξέων, και πολλές έρευνες έχουν αφιερωθεί σ' αυτό το αντικείμενο.

20 Η πρωτοταγής δομή ορισμένων λιπασών έχει καθοριστεί και περιγραφεί στη βιβλιογραφία (Boel et al., *Lipids* 23, 701-706 (1988), de Caro et al., *Biochim. Biophys. Acta* 671, 129-138 (1981), Winkler et al., *Nature* 343, 771-774 (1990)). Περαιτέρω, έχει εξακριβωθεί η τυποποίηση δομής ενός πολύ μικρότερου αριθμού λιπασών (Winkler et al., *Nature* 343, 771-774 (1990), Brady et al., *Nature* 343, 767-770 (1990) J. D. Schrag et al., *Nature* 351, 1991, pp. 761-764). Από αυτές τις έρευνες φαίνεται ότι οι λιπάσες έχουν κοινά συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά, αλλά από την άλλη πλευρά, υπάρχουν επίσης βασικές δομικές παραλλαγές μεταξύ των λιπασών.

Σύνοψη της εφεύρεσης

Περαιτέρω έρευνες έχουν δεῖξει ότι οι βελτιωμένες ιδιότητες των λιπασών μπορούν να προκύψουν με μία ή περισσότερες ειδικές μεταλλαγές στην αλληλουχία του DNA που εκφράζει μια ειδική λιπάση για την αιτόκτηση παραλλαγών λιπάσης που εμφανίζουν τέτοιες βελτιωμένες ιδιότητες.

30 Συνεπώς, από μιαν άποψη, η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται σε μια παραλλαγή λιπάσης της γονικής λιπάσης που περιέχει μια καταλυτική δίκην θρυψίνης τριάδα περιλαμβάνουντα μια ενεργή σερινή κείμενη σε ένα κατ' εξοχήν υδρόφοβο, επιμήκη θύλακα σύνδεσης του μορίου της λιπάσης, όπου το ηλεκτροστατικό φορτίο ή/και η υδροφοβία της λιπιδικής ζώνης επαφής της γονικής λιπάσης αλλάζει με την εξάλειψη ή την αντικατάσταση ενός ή περισσότερων αριθμητικά φορτισμένων καταλύτων αμινοξέων με ουδέτερο ή θετικά φορτισμένο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων. ή/και με την αντικατάσταση ενός ή περισσότερων ουδετέρων καταλύτων αμινοξέων με θετικά φορτισμένο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων, ή/και με εξάλειψη ή αντικατάσταση ενός ή περισσότερων υδρόφιλων καταλύτων αμινοξέων με υδρόφοβο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων. Προς χάριν ευκολίας, αυτή η παραλλαγή λιπάσης ορίζεται στα ακόλουθα ως παραλλαγή λιπάσης I.

40 Στο παρόν κείμενο, ο δρος «δίκην θρυψίνη» υποδηλώνει ότι η γονική λιπάση αιτοτελείται από μια καταλυτική τριάδα στο ενεργό κέντρο που αντιστοιχεί σε αυτό της θρυψίνης, π.χ. τα αμινοξέα Ser, His και ένα από τα Asp, Glu, Asn ή Gln. Μερικές λιπάσες μπορούν επίσης να περιλαμβάνουν μια επιφανειακή δομή βρόχου η οποία και λύπτει την ενεργή σερινή σταν η λιπάση είναι σε ανενεργή μορφή (ένα παραδειγμα μιας τέτοιας λιπάσης περιγράφεται υπό Brady et al., *Nature* 343, 1990, pp. 767-770). Όταν η λιπάση ενεργοποιείται, η δομή βρόχου μεταποτίζεται ώποτε να εκθέσει τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου, δημιουργώντας μια επιφάνεια με αυξημένη επιφανειακή υδροφοβία η οποία αλληλεπιδρά με το λιπιδικό υπόπεδωμα στην ή κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Για αυτό το υκοτό, αυτή η επιφάνεια ορίζεται ως η «λιπιδική ζώνη επαφής», που προορίζεται να περιλάβει τις κατάλοιπα αμι-

νοξέων που βιβύσκονται εντάς ή σχηματίζουν μέρος της επιφάνειας. Αυτά τα κατάλοιπα μπορούν να συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση της λιπάσης με το υπόστρωμα στην ή κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης όπου η λιπάση υδρολύσει τριγλυκερίδια από τη λιπιδική φάση ώταν ενεργοποιείται από την επαφή με την λιπιδική επιφάνεια. Κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης των τριγλυκερίδων, σχηματίζονται σε διάφορες ποσότητες λιπαρές οξέες και μονο- και δι- γλυκερίδια. Ένας λόγος για την αλλαγή του ηλεκτροστατικού φορτίου ή/και της υδροφοβίας της λιπιδικής ζώνης επαφής μέσω μετάλλαξης της λιπάσης σε αυτή τη ζώνη είναι ότι τα λιπαρά οξέα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης μπορούν να παραμένουν στη λιπιδική φάση. Σχηματίζοντας έτοι μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια. Όταν η λιπάση χρησιμοποιείται για σκοπούς πλύσης, τα αρνητικά φορτισμένα απορρυπαντικά μπορούν να σχηματίσουν αρνητικά φορτία πάνω στη λιπιδική επιφάνεια. Έτσι, με την παρασκευή των παραλλαγών λιπάσης που είναι λιγότερο αρνητικά φορτισμένες ή/και περισσότερο υδρόφοβες, είναι δυνατό να ληφθούν λιπάσες με διαφορετικές εξιδεικεύσεις ή/και βελτιωμένες ιδιότητες.

Η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται επίσης σε μια κατασκευή DNA περιλαμβάνουσα μια αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί μια παραλλαγή λιπάσης όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε έναν ανασυνδυασμένο φορέα έκφρασης που φέρει η ορθείνα κατασκευή DNA, σε ένα κύταρο μεταμορφωμένο με τη κατασκευή DNA ή τον φορέα έκφρασης, διώς επίσης σε μια μέθοδο παραγωγής μιας παραλλαγής λιπάσης της εφεύρεσης μέσω καλλιέργειας ή ανάπτυξης του ορθέντος κυττάρου υπό συνθήκες που οδηγούν στην παραγωγή της παραλλαγής λιπάσης, μετά την οποία η παραλλαγή λιπάσης ανακτάται από την καλλιέργεια.

Η εφεύρεση αναφέρεται περαιτέρω σε ένα απορρυπαντικό πρόσθετο περιέχον μια παραλλαγή λιπάσης της εφεύρεσης, κατ' επιλογήν με τη μορφή μιας μη κονιώδους κόκκου, σταθεροποιημένου υγρού ή προστατευμένου ενζύμου, διώς επίσης σε μια απορρυπαντική σύνθεση περιλαμβάνουσα την παραλλαγή λιπάσης της εφεύρεσης.

Δεπτομετρής περιγραφή της εφεύρεσης

Στην παρούσα περιγραφή και στις αξιώσεις, χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες συντομογραφίες:

25 Αλινοξέα:

A	=	Ala	=	Αλανίνη	
V	=	Val	=	Βαλίνη	
L	=	Leu	=	Λευκίνη	
I	=	Ile	=	Ισολευκίνη	
30	P	=	Pro	=	Προλίνη
	F	=	Phe	=	Φανυλαλανίνη
	W	=	Trp	=	Τρυπτοφάνη
	M	=	Met	=	Μεθειονίνη
	G	=	Gly	=	Γλυκίνη
35	S	=	Ser	=	Σερίνη
	T	=	Thr	=	Θρεονίνη
	C	=	Cys	=	Κυστεΐνη
	Y	=	Tyr	=	Τυροσίνη
40	N	=	Asn	=	Ασπαραγίνη
	Q	=	Gln	=	Γλουταμίνη
	D	=	Asp	=	Ασπαρτικό οξύ
	E	=	Glu	=	Γλουταμινικό οξύ
	K	=	Lys	=	Λυσίνη
45	R	=	Arg	=	Αργινίνη
	H	=	His	=	Ιστιδίνη

Στην περιγραφή των παραπάνω λιπάντης σύμφωνα με την εφεύρεται, χρησιμοποιείται η ιακώλουσθη ονοματολογία προς ευκολία αναφοράς:

Αρχικό αμινοξύ (-έα): Ήση (-εις): υποκατεστημένο αμινοξύ (-έα)

Σύμφωνα με αυτή την ονοματολογία, για παράδειγμα η αντικατάστωση του γλουταμινικού οξείου από γλυκίνη στη θέση 195 απεικονίζεται ως εξής:

Gly 195 Glu ή G195E

η εξάλειψη της γλυκίνης στην ίδια θέση απεικονίζεται ως:

Gly 195 * ή G195*

και η ένθεση ενός πρόσθιου κατάλοιπου αμινοξέος δπως η λυσίνη απεικονίζεται ως:

Gly 195 GlyLys ή G195GK

Όπου η ειδική λιπάση περιλαμβάνει μια «εξάλειψη» συγχριτικά με άλλες λιπάσες και εκτελείται μια ένθεση σε μια τέτοια θέση πατό υποδεικνύεται ως εξής:

* 36 Asp ή *36D

για την ένθεση ενός ασπαρτικού οξείου στη θέση 36

15 Οι πολλαπλές μεταλλαγές διαχωρίζονται με συν. π.χ.:

Arg 170 Tyr + Gly 195 Glu ή R170Y + G195E

παριστάνει μεταλλαγές στις θέσεις 170 και 195 υποκαθιστώντας την τυροσίνη και το γλουταμινικό οξύ με αργινίνη και γλυκίνη, αντίστοιχα.

20 Σύμφωνα με την εφεύρεται, η παραλλαγή λιπάσης I είναι κατά προτίμηση μια παραλλαγή στην οποία ένα ή περισσότερα κατάλοιπα γλουταμινικού οξείου ή ασπαρτικού οξείου της λιπιδικής ζώνης επαφής της λιπάσης αντικαθίστανται από γλουταμίνη, ασπαραγίνη, αλανίνη, λευκίνη, βαλίνη, σερίνη, θρεονίνη, λυσίνη ή αιργινίνη.

Παρόλο που η γονική λιπάση μπορεί να εξαχθεί από μια ποικιλία πηγών δπως λιπάσες θηλειστικών, π.χ. πανγκρεατικές, γαστρικές, ηπατικές ή λυπορυπτεΐνικές λιπάσες, γενικώς προτιμάται να είναι μια μικροβιακή λιπάση. Ως τέτοια, η γονική λιπάση επιλέγεται από ζυμομύκητα, π.χ. λιπάσες Candida, ή βακτήριο, π.χ. λιπάσες Pseudomonas ή μύκητα, π.χ. λιπάσες Humicola ή Rhizomucor. Ιδιαίτερα προτιμάται η επιλογή της γονική λιπάσης από μια ομάδα δομικών ομόλογων λιπασών.

25 Σε μια προτιμούμενη ενσωμάτωση της παραλλαγής λιπάσης I της εφεύρεσης, η γονική λιπάση είναι μια λιπάση Rhizomucor miehei, ειδικότερα η λιπάση που περιγράφεται στην EP 305 216. Σε αυτή την ενσωμάτωση, ένα ή περισσότερα κατάλοιπα αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων μπορούν να υποκατασταθούν με ένα ή περισσότερα κατάλοιπα θετικά φορτισμένων ή συδέτερων αμινοξέων ως ακολούθως:

D91N, K, R, A, V, L, S, T

D256N, K, R, A, V, L, S, T

D226N, K, R, A, V, L, S, T

35 D61N, K, R, A, V, L, S, T

D113N, K, R, A, V, L, S, T

E201Q, K, R, A, V, L, S, T

D243N, K, R, A, V, L, S, T

40 Σε μια άλλη προτιμούμενη ενσωμάτωση της παραλλαγής λιπάσης I της εφεύρεσης, η γονική λιπάση είναι μια λιπάση Humicola lanuginosa, ειδικότερα η λιπάση που παράγεται από το στέλεχος DSM 4106 του H. lanuginosa (βλέπε EP 258 068). Σε αυτή την ενσωμάτωση, ένα ή περισσότερα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων μπορούν να αντικατασταθούν με ένα ή περισσότερα συδέτερα ή θετικά φορτισμένα κατάλοιπα αμινοξέων ως κάτωθι:

45

5 E87Q, K, R, A, N, T, S, L, V·
D254N, K, R, A, Q, T, S, L, V·
D242N, K, R, A, Q, T, S, L, V·
E210Q, K, R, A, N, T, S, L, V·
E56Q, K, R, A, N, T, S, L, V·
D96N, K, R, A, Q, T, S, L, V·
D111N, K, R, A, Q, T, S, L, V·
D62A, Q, N, T, S, K, R, L, V·
E219A, Q, N, T, S, K, R, L, V·
10 E234A, Q, N, T, S, K, R, L, V·
E57A, Q, N, T, S, K, R, L, V·
E99A, Q, N, T, S, K, R, L, V·
D27A, Q, N, T, S, K, R, L, V·
E239A, Q, N, T, S, K, R, L, V·
15

Ιδιαίτερα προτιμούμενες αντικαταστάσεις σύμφωνα με την εφεύρεση είναι

20 E87Q + D254N + D242N + E210Q·
E87Q + D254N + E210Q·
D96N + E87Q + D254N·
R209A + E210A.

Εναλλακτικά, ένα ή περισσότερα κατάλοιπα υπδέτεραν ιμινοξέων μπορεί να αντικατασταθούν με ένα ή περισσότερη θετικώς φορτισμένα κατάλοιπα αιμινοξέων ως κάτωθι:

25 T267K, R·
S85K, R·
T226K, R·
N88K, R·
N92K, R·
30 I255K, R·
I202K, R·
L206K, R·
L259K, R·
V203K, R· ή
35 L227K, R

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η λιπάση Humicola lanuginosa και η λιπάση Rhizomucor miehei ανήκουν στην ίδια ομάδα λιπασών. Αυτό συνεπάγεται ότι η συνολική τρισδιάστατη δομή των δύο λιπασών μοιάζει πολύ και έχει δειχθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X ότι είναι τιψήλι ομόλογες (ένα μοντέλο υπολογιστή της λιπάσης H. lanuginosa και της Rh. miehei απεικονίζεται στις Εικόνες 1A και B και 2A και B, αντίστοιχα, από τις οποίες οι ομοιότητες ανάμεσα στις λιπιδικές ζώνες επαφής των δύο λιπασών διακρίνονται σαφώς). Συνεπώς, είναι πιθανόν ότι οι τροποποιήσεις του υποδεικνυόμενου τύπου για κάθε λιπάση να είναι επίσης λειτουργικές για την άλλη λιπάση.

40 45 Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με την εφεύρεση, οποιαδήποτε των τροποποιήσεων της αλληλουχίας των αιμινοξέων που αναφέρθηκε παραπάνω για την παραλλαγή λιπάσης I μπορεί να συνδυαστεί με οποιαδήποτε άλλη τροποποιήση που αναφέρθηκε παραπάνω ή με οποιαδήποτε των τροποποιήσεων για τις παραλλαγές II και III που περιγράφονται στην WO 92/05249.

Μέθισδι πιεμιακευτής των παραμέλλεται γιαντάσης της εφεύρεταις

Μερικές μέθισδι για την εισαγωγή μεταλλάξεων σε γονιδία είναι γνωστές στην τεχνική. Μετά από μια σύντομη συζήτηση για την κλωνοποίηση των καθικοποιητικών της λιπάσης DNA αλληλουχιών, θα συζητηθείν οι μέθοδοι δημιουργίας μεταλλαγών σε ειδικές θέσεις στην αλληλουχία καθικοποιητικής της λιπάσης.

5

Κλωνοποίηση μιας καθικοποιητικής της λιπάσης αλληλουχίας DNA

Η DNA αλληλουχία που καθικοποιεί μια γονική λιπάση μπορεί να απομονωθεί από ένα αποιοδήποτε κύτταρο ή μικροοργανισμό που παράγει την υπό συζήτηση λιπάση με διάφορες μεθόδους, γνωστές στην τεχνική. Πρώτον είναι γονιδιακό DNA ή/και μια βιβλιοθήκη cDNA θα πρέπει να καταποκευαστεί χρησιμοποιώντας χρωμοσωματικό DNA ή αγγελιαφόρο RNA από τον οργανισμό που παράγει την υπό μελέτη λιπάση. Ακολούθως, αν η αλληλουχία αμινοξέων της λιπάσης είναι γνωστή, μπορούν να παρασκευαστούν και να χρησιμοποιηθούν ομόλογοι επισημασμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί ανιχνευτές στην αναγνώριση των κλάνων που καθικοποιούν τη λιπάση από μια βιβλιοθήκη του γονιδιώματος του βιακτηριακού DNA. ή από μια βιβλιοθήκη από ένα μικητακό cDNA. Εναλλακτικά, ένας επισημασμένος ολιγονουκλεοτιδικός ανιχνευτής που περιλαμβάνει αλληλουχίες ομόλογες της λιπάσης από άλλο στέλεχος βιακτηριών ή μύκητων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής για την εξακρίβωση των κλάνων που καθικοποιούν τη λιπάση, με τη χρήση συνθηκών υψηδοποίησης και ξεπλύματος ελαττιωμένης αυστηρότητας.

Επιπλέον άλλη μια μέθοδος για την εξακρίβωση κλάνων που παράγουν λιπάση περιλαμβάνει την ένθεση θραυσμάτων γονιδιακού DNA εντός ενός φορέα έκφρασης, διας ένα πλασμίδιο, τη μεταμόρφωση βιακτηριών αφρητικών στη λιπάση με την προκύπτουσα βιβλιοθήκη γονιδιακού DNA, και ακολούθως την τοποθέτηση των μεταμόρφωμάνων βιακτηρίων σε άγαρ που περιέχει ένα υπόστρωμα για τη λιπάση. Αυτά τα βιακτηρία που περιέχουν πλασμίδιο που φέρει λιπάση θα παράγουν αυτοκίνες περιβαλλόμενες από μια άλλη διασυγόνια άγια, λόγω της χώνευσης του υποστρώματος από την αποβαλλόμενη λιπάση.

Εναλλακτικά, η DNA αλληλουχία που καθικοποιεί το ένζυμο μπορεί να παρασκευαστεί συνθετικά με καθιερωμένες τυπικές μεθόδους, π.χ. τη φωσφοαμιδική μέθοδο που περιγράφεται υπό S. L. Beaucage and M. H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, pp. 1859-1869, ή τη μέθοδο που περιγράφεται υπό Matthes et al., The EMBO J. 3, 1984, pp. 801-805. Σύμφωνα με τη φωσφοαμιδική μέθοδο, τα ολιγονουκλεοτίδια παρασκευάζονται, π.χ., εντός αυτόματου παρασκευαστή DNA, καθαρίζονται, ανασυνδέονται, συνδέονται και κλωνοποιούνται εντός καταλληλου φορέων. Τελικώς, η DNA αλληλουχία μπορεί να είναι μικτής γονιδιακής και συνθετικής, μικτής συνθετικής και cDNA ή μικτής γονιδιακής και cDNA προέλευσης παρασκευασμένη από τη σύνδεση θραυσμάτων συνθετικής, γονιδιακής ή cDNA προέλευσης (διας συμφέρει), διου τα θραυσμάτα αντιστοιχούν στα διάφορα τμήματα διης της DNA αλληλουχίας, σύμφωνα με πρότυπες τεχνικές. Η DNA αλληλουχία μπορεί επίσης να παρασκευαστεί από αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές, για παράδειγμα διας περιγράφεται στην US 4.683.202 ή υπό R. K. Saiki et al., Science 239, 1988, pp. 487-491.

35

Μεταλλαγές γένεσης κατευθυνόμενης θέσης της αλληλουχίας που καθικοποιεί τη λιπάση

Όταν απομονωθεί η DNA αλληλουχία που καθικοποιεί τη λιπάση, και έχουν εξακριβωθεί οι επιθυμητές θέσεις για τη μεταλλαγή, οι μεταλλαγές μπορούν να εισαχθούν με τη χρήση συνθετικών ολιγονουκλεοτιδιών. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια περιέχουν αλληλουχίες νουκλεοτίδων που στέκονται δίπλα στις επιθυμητές θέσεις μεταλλαγής. Τα μεταλλαγμένα νουκλεοτίδια εισάγονται κατά τη διάρκεια της ολιγονουκλεοτιδικής σύνθετης. Σε μια ειδική μέθοδο, ένα μονόκλωνο χάσμα του DNA που γεφυρώνει την αλληλουχία που καθικοποιεί τη λιπάση, δημιουργείται εντός ενός φορέα που φέρει το γονίδιο λιπάσης. Ακολούθως το συνθετικό νουκλεοτίδιο, που φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή, ανασυνδέεται σε μια ομόλογη περιοχή του μονόκλωνου DNA. Το παραμένον χάσμα απολούθιως πληρώνεται με DNA πολυμεράση I (θραύσμα Klenow) και η δομή συνδέεται με τη χρήση λγκάσης T4. Σε ένα ειδικό παράδειγμα αυτής της μεθόδου περιγράφεται υπό Morinaga et al., (1984, Biotechnology 2: 646-639). Στην Ευρ. ΗΠΑ Νο. 4.760.025 υπό Estell et al., που δημοσιεύτηκε στις 26 Ιουλίου 1988, περιγράφεται η εισαγωγή ολιγονουκλεοτιδίων που καθικοποιούν πολλαπλές μεταλλαγές μέσω πραγματοποίησης ελέγχου της παρασκευαστικής της κασ-

υέτυς, εντούτως, μπορεί να εισαχθεί μιας ακόμη μεγαλύτερη ποικιλία μετιύλαγυν σε υποιδήποτε χρόνο με τη μέθοδο Morinaga, επειδή μπορεί να εισαχθεί μια πολλαπλάτητα ωλιγονούκλειτιδίων με διαφυλετικά μήκη.

Μια άλλη μέθοδος εισαγωγής μεταλλαγών σε αλληλουχίες που κωδικοποιούν τη λιπάση περιγράφεται υπό Nelson and Long, *Analytical Biochemistry* 180, 1989, pp. 147-151. Αυτή περιλαμβάνει την εκ τριών σταδίων δημιουργίαν ενδιαφέροντος PCR που περιέχει την επιθυμητή μεταλλιγή που εισάγεται με τη χρήση ενός χημικά παρακενασιμένου κλώνου DNA ως ένα από τους εκκινητές στις αντιδράσεις PCR. Από το από την PCR δημιουργήν μενού θραύσμα, μπορεί να απομανθεί ένα θραύσμα DNA περιέχον τη μετιύλαγη μέσω διάσπασης με ενδονούκλεαστικές περιορισμού και την επανένθεση σε ένα πλασμίδιο έκφρασης (βλέπε επίσης τις Εικ. 3 και 4 στις οποίες απεικονίζεται περαιτέρω αυτή η μέθοδος).

10

Έκφραση των παραλλαγών λιπάσης

Σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση, μια μεταλλαγμένη αλληλουχία που κωδικοποιεί τη λιπάση που παράγεται με τις ανωτέρω περιγραφέσεις μεθόδους, ή με οποιαδήποτε εναλλακτική μέθοδο γνωστή στην τεχνική, μπορεί να εκφραστεί σε ενζυμική μορφή, με τη χρήση ενός φορέα έκφρασης ο οποίος τυπικά περιλαμβάνει αλληλουχίες ελέγχου που κωδικούν έναν προαγωγέα, έναν χειριστή, τη ριβοσωμική θέση δέσμευσης, τη μετάφραση του σήματος έναρξης, και κατ' επιλογήν ένα γονιδιακό καταστολέα ή διάφορους γονιδιακούς ενεργοποιητές. Για να επιτραπεί η απέκκριση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης, τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν ένα «σήμα αλληλουχίας» μπορούν να εισαχθούν πριν την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη λιπάση. Για την έκφραση υπό τη φορά των αλληλουχιών ελέγχου, ένα γονίδιο στόχους προς επεξεργασία σύμφωνα με την εφεύρεση συνδέεται λειτουργικά με τις αλληλουχίες ελέγχου στο κατώληκο πλάσιο ανάγνωσης. Οι αλληλουχίες του προαγωγέα που μπορούν να ενσωματωθούν στους πλασμιδικούς φορείς, και οι οποίες μπορούν να στηρίξουν τη μεταγραφή του μεταλλαγμένου γονιδίου λιπάσης, περιλαμβάνουν χωρίς περιορισμό τον προκαρυωτικό προσταγμέα β-λακταμάσης (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731) και τον προαγωγέα lac (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Περαιτέρω αναφορές μπορούν επίσης να βρεθούν στο «Useful proteins from recombinant bacteria» στο Scientific American, 1980, 242: 74-94.

25

Σύμφωνα με μια ενσωμάτωση στο *B. subtilis* μεταμορφώνεται από έναν φορέα έκφρασης που φέρει το μεταλλαγμένο DNA. Αν η έκφραση πρόσκειται να λάβει χώρα σε έναν απεκχριτικό μικροοργανισμό δύος στο *B. subtilis* μια αλληλουχία σήματος μπορεί να ακολουθήσει τη μετάφραση του σήματος έναρξης και προηγείται της DNA αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει. Η αλληλουχία σήματος δραί για τη μεταφορά του πρωτεΐνης έκφρασης στο κυτταρικό τοίχωμα δύον διασπάται από το προϊόν κατά την απέκκρισης. Ο δρός «αλληλουχίες ελέγχου» δύος ορίζονται ανωτέρω περιλαμβάνουν μια αλληλουχία σήματος, σταν είναι παρούσα.

35

Στην παρούσα προτιμούμενη μέθοδο παραγωγής παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης, ως ξενιστής οργανισμός χρησιμοποιείται ένας νηματώδης μύκητας. Ο ξενιστής οργανισμός νηματώδης μύκητας μπορεί προσφέρωντας να είναι ένας μύκητας που έχει χρησιμοποιηθεί προτιγουμένως ως ξενιστής προς παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεΐνων, π.χ. ένα στέλεχος του *Aspergillus* sp., δύος *A. niger*, *A. nidulans* ή *A. oryzae*. Η χρήση των *A. oryzae* στην προσταγμή των ανασυνδυασμένων πρωτεΐνων περιγράφεται εκτενώς, π.χ. στην EP 238 023.

40

Για την έκφραση των παραλλαγών λιπάσης στον *Aspergillus*, ένας προαγωγέας προηγείται της DNA αλληλουχίας που κωδικοποιεί την παραλλαγή λιπάσης. Ο προσταγμής μπορεί να είναι οποιαδήποτε αλληλουχία DNA που εμφανίζει μια ισχυρή μεταγραφική δραστικότητα στον *Aspergillus* και μπορεί να εξιχθεί από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια εξωκυτταρική ή εσωκυτταρική πρωτεΐνη δύος μια αμυλάση, μια γλυκοαμιλάση, μια πρωτεΐνη, μια λιπάση, μια κυτταρινάση ή ένα γλυκολυπικό δένζυμο.

45

Παραδείγματα κατάλληλων προσταγμάτων είναι οι εξαγόμενοι από το γονίδιο που κωδικοποιεί την αμυλάση TAKA *A. oryzae*, *Rhizomucor miehei* ασπαρτική πρωτεΐνα, *A. niger* συδέτερη α-αμυλάση, *A. niger* σταθερή σε οξεία α-αμυλάση, *A. niger* γλυκοαμιλάση, *Rhizomucor miehei* λιπάση, *A. oryzae* αλκαλική πρωτεΐνη ή *A. oryzae* ισομεράση φωσφορικής τρισδιάσης.

Ειδικότερα σταν ο ξενιστής οργανισμός είναι ο *A. oryzae*, ένας προτιμούμενος προσταγμής για χρήση στη μέθοδο της παρούσας εφεύρεσης είναι ο προσταγμής αμυλάση *A. oryzae* TAKA καθώς εμφανίζει μια ισχυρή μετα-

γραφική δραστικότητα στον Δ. οργανός. Η αλληλουχία του προιεγγένει της εφαρμογής ΤΑΚΑ περιγράφεται στην ΕΠ 238 023.

Οι αλληλουχίες τερματισμού και πολυαδενυλώσης μπορούν κατάλληλα να εξεχθούν από τις ίδιες πηγές όπως του προσαγωγέα.

5 Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη μεταμόρφωση ενός ξενιστή κυττάρου μόνη της μπορούν να είναι καταλήλως όπως περιγράφονται στην ΕΠ 238 023.

10 Για τη διασφάλιση της απέκκρισης της παραπλανής λιπάσης από το κύτταρο ξενιστή, ένα σήμα αλληλουχίας προηγείται της DNA αλληλουχίας που κωδικοποιεί την παραλλαγή της λιπάσης το οποίο μπορεί να είναι ένα φυσικός απαντώμενο σήμα αλληλουχίας ή ένα δραστικό τμήμα αυτού ή μια συνθετική αλληλουχία παρέχουσα έκκριση της πρωτεΐνης από το κύτταρο. Ειδικότερα, η αλληλουχία σήματος μπορεί να προέχεται από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια αμυλάση ή γλυκοαμυλάση Aspergillus sp, ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια λιπάση ή πρωτεΐνη Rhizomucor micheei, ή ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια κυτταρινάση ξυλανάση ή λιπάση Humicola. Η αλληλουχία σήματος κατά προτίμηση εξάγεται από ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την αμυλάση ΤΑΚΑ Δ. οργανός, την συδέτεση α-αμυλάση A. niger, την σταθερή σε οξεία α-αμυλάση A. niger ή την γλυκοαμυλάση A. niger.

15 Το μέσο που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των μεταμόρφωμάρων ξυττάρων ξενιστών μπορεί να είναι οποιοδήποτε συμβιτικό μέσο κατάλληλο για την ανάττυξη των κυττάρων Aspergillus. Οι μεταμόρφωμένοι τύποι είναι συνήθως σταθεροί και μπορούν να καλλιεργηθούν απονιά επιλεκτικής πίεσης. Εντούτοις, αν οι μεταμόρφωμένοι τύποι βρεθούν ότι είναι αισθαντές, ένας εισαγόμενος δείκτης επιλογής στα κύτταρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή.

20 Η απεκχρινόμενη πρωτεΐνη ώριμης λιπάσης από τα κύτταρα ξενιστές μπορεί προσφέρως να αναπτηθεί από το μέσο καλλιέργειας με γνωστές μεθόδους που περιλαμβάνουν το διαχωρισμό των κυττάρων από το μέσο μέσω φυγοκέντρησης ή διήθησης, και την κατακρήμνιση των πρωτεΐνικών συστατικών του μέσου με ένα άλις όπως θεικό αμμόνιο, με ακόλουθες χρωματογραφικές μεθόδους όπως ιωντοανταλλακτική χρωματογραφία, χρωματογραφία συγγένειας και τα παρόμια.

25 Η παρούσα εφεύρεση αναφέρεται επίσης σε ένα απορρυπαντικό πρόσθετο που περιλαμβάνει μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την εφεύρεση, κατά προτίμηση με τη μορφή μη κονιώδους κόκκου, σταθεροποιημένου υγρού ή προστατευμένου ενζύμου. Οι μη κονιώδεις κόκκοι μπορούν να παραχθούν π.χ. σύμφωνα με τις ΕΠ. ΗΠΑ 4.106.991 και 4.661.452 (αιμφότερες της Novo Industry A/S) και μπορούν κατ' επιλογήν να επικαλυφθούν με μεθόδους γνωστές στην τεχνική. Τα υγρά ενζυμικά παρασκευάσματα μπορούν, π.χ., να σταθεροποιηθούν με την προσήκη μιας πολυόλης όπως προπολεογλυκόλη, ενός σακχάρου ή σπαχαροαλκοόλης, λακτικού οξείου ή βορικού οξείου σύμφωνα με καθεραιμένες μεθόδους. Άλλοι ενζυμικοί σταθεροποιητές είναι γνωστοί στην τεχνική. Τα προστατευμένα ένζυμα μπορούν να παρασκευαστούν σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην ΕΠ 238 216.

30 Το απορρυπαντικό πρόσθετο μπορεί καταλήλως να περιέχει από 0,02-200 χλστγρ. ενζυμική πρωτεΐνη ανά γραμμάριο προσθέτου. Θα καταστεί κατανοητό ότι το απορρυπαντικό πρόσθετο μπορεί περιπτέρως να περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα άλλα ένζυμα, διότι μια πρωτεΐνη, κυτταρινάση, υπεροξειδάση ή αμυλάση, περιλαμβανομένων προσφέρων σε απορρυπαντικά πρόσθετα.

40 Κατά μιαν ακόμη περιπτέρω απόψη, η εφεύρεση παναφέρεται σε μια απορρυπαντική σύνθεση περιέχουσα μια παραλλαγή λιπάσης της εφεύρεσης. Οι απορρυπαντικές συνθέσεις της εφεύρεσης επιπροσθέτως περιέχουν επιφανειοδραστικά τα οποία μπορούν να είναι ανιοντικού, μη ιονικού, κατιοντικού επαμφοτερεύοντος ή οβιτεριονικού τύπου όπως επίσης ως μγματικά αινιόντων των επιφανειοδραστικών κλάσεων. Τυπικά παραδείγματα κατάλληλων επιφανειοδραστικών είναι γραμμικά βενζολοσουλφονικά αλκύλαια (LAS), άλφα ολεφινοσουλφονικά (AOS), αλκοολοιανθεικά (AEOS), αλκοολανθεικά (AO), αλκυλοιανθεικά (AS), αλκυλοπολυγλυκούσιτες (APG) και άλλα αλκαλιμετάλων με φυσικά λιπαρά οξέα.

45 Οι απορρυπαντικές συνθέσεις της εφεύρεσης μπορούν να περιέχουν άλλα απορρυπαντικά συστιτικά γνωστά στην τεχνική όπως π.χ. σώματα απορρυπαντικών, λευκαντικά, ενεργοποιητές λευκανσης, αντιδιαβολικά, μέσα διαχωρισμού, μέσα αντι-επαναπόθεσης γύπων, αρώματα, σταθεροποιητές ενζύμου κ.λπ.

Η απορρυπαντική σύνθετη της εφεύρεσης μπορεί να μορφωτεί πλόιαφυρή μορφή, π.χ. ως σκόνη ή υγρό. Το ένζυμο μπορεί να σταθεροποιηθεί σε ένα υγρό απορρυπαντικό μέσω έγκλεισης των σπασμάτων ενζύμων όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Συνήθως, το πεχιά ενδς διαιλύματος της απορρυπαντικής σύνθετης της εφεύρεσης θα είναι 7-12 και σε μερικές περιπτώσεις 7-10.5. Άλλα ενζυμακά απορρυπαντικά όπως πρωτεΐνες, κυτταρινάσες, υπεροξειδάσες ή αμιλάσες μπορεί να περιέχονται στις απορρυπαντικές συνθέσεις της εφεύρεσης, είτε ξεχωριστά είτε σε ένα συνδυασμένο πρόσθιο όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Σύντομη περιγραφή των σχέδιων

Η παρούσα εφεύρεση περιγράφεται ακολούθως με αναφορά στα συναπόδιμα σχέδια στα οποία

Οι Εικόνες 1A και B είναι μοντέλα σχεδιασμένα στον ηλεκτρονικό υπολογιστή και απεικονίζουν μια τρισδιάστατη δομή της λιπιδικής ζύνης επαφής της λιπάσης *H. lanuginosa* σταν η λιπάση είναι σε ανενεργή (A) και ενεργή (B) μορφή, αντίστοιχα. Τα «λειτακά» κατάλοιπα παριστάνουν υδρόφιλα αμινοξέα (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly, και Met), τα «κάτρινα» παριστάνουν υδρόφιλα αμινοξέα (Thr, Ser, Glu, Asn, Tyr και Cys), τα «μπλε» παριστάνουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Lys, Arg και His), και τα «ερυθρά» παριστάνουν αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (Glu και Asp):

Οι Εικόνες 2A και 2B είναι μοντέλα υπολογιστή και απεικονίζουν μια τρισδιάστατη δομή της λιπιδικής ζύνης επαφής της λιπάσης *Rh. miehei* σταν η λιπάση είναι σε ανενεργή (A) και ενεργή (B) μορφή, αντίστοιχα. Τα «λευκά» κατάλοιπα παριστάνουν υδρόφιλα αμινοξέα (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Gly, και Met), τα «κάτρινα» παριστάνουν υδρόφιλα αμινοξέα (Thr, Ser, Glu, Asn, Tyr και Cys), τα «μπλε» παριστάνουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Lys, Arg και His), και τα «ερυθρά» παριστάνουν αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (Glu και Asp):

Η Εικ. 3 είναι μια σχηματική παράσταση της παρασκευής των πλασμαδίων που καθικοποιούν παραλλαγές λιπάσης μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR):

Η Εικ. 4 είναι μια σχηματική παράσταση της τριών σταδίων μεταλλαξιγένεσης μέσω PCR.

Η Εικ. 5 απεικονίζει ένα χάρτη περιορισμού του πλασμαδίου pAO1:

Η Εικ. 6 απεικονίζει ένα χάρτη περιορισμού του πλασμαδίου pAHL· και

Η Εικ. 7 απεικονίζει ένα χάρτη περιορισμού του πλασμαδίου pARML.

Η παρούσα εφεύρεση περιλαμβάνει απεικονίζεται στα ακόλουθα παραδείγματα τα οποία με κανένα τρόπο δεν περιορίζουν το σκοπό της εφεύρεσης ως αξιώνται.

Γενικές μέθοδοι

Έκφραση της λιπάσης *Humicola lanuginosa* και της λιπάσης *Rhizomucor miehei* στον *Aspergillus oryzae*:

Η κλωνοποίηση της λιπάσης *Humicola lanuginosa* και της λιπάσης *Rhizomucor miehei* περιγράφεται στην EP 305,216 και EP 238 023, αντίστοιχα. Αυτές οι εφαρμογές εφεύρεσεν επίσης περιγράφουν την έκφραση και το χαρακτηρισμό των δύο λιπασών στον *Aspergillus oryzae*. Το δύο πλασμαδία έκφρασης που χρησιμοποιούνται ορίζονται ως p960 (που φέρει το γονίδιο λιπάσης *H. lanuginosa*) και p787 (που φέρει το γονίδιο λιπάσης *R. miehei*).

Τα πλασμαδία έκφρασης που χρησιμοποιούνται σε αυτή την εφαρμογή είναι απαραίλακτα με τα p787 και p960, εκτός από ελάχιστες τροποποιήσεις αμέσως στο 3' στις περιοχές κωδικοποίησης της λιπάσης. Οι τροποποιήσεις εκτελέστηκαν με τον ακόλουθο τρόπο: το p960 χωνεύτηκε με τα περιοριστικά ένζυμα NruI και BamHI. Ανάμεσα σε αυτές τις δύο θέσεις το θραύσμα BamHI/NheI από το πλασμαδίο pBR322, στο οποίο το θραύσμα NheI πληρώθηκε με πολυμεράση Klenow, κλωνοποιήθηκε, και έτσι δημιουργήθηκε το πλασμαδίο pAO1 (Εικ. 5) το οποίο περιέχει τις μοναδικές θέσεις BamHI και NheI. Ανάμεσα σε αυτές τις μοναδικές θέσεις τα θραύσματα BamHI/XbaI από τα p960 και p787 κλωνοποιήθηκαν παρέχοντας το pAHL (Εικ. 6) και pARML (Εικ. 7), αντίστοιχα.

Μεταλλαξιγένειη κατευθυνόμενης θέσης in vitro των γονιδίων λιπάσης:

Για την εισαγωγή μεταλλαγών στα γονίδια λιπάσης χρησιμοποιήθηκαν τις διαφορετικές προσεγγίσεις.

Μια μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν η κατευθυνόμενης θέσης μεταλλαξιγένειη ολιγονουκλεοτίδιον η οποία περιγράφεται υπό Zoller & Smith, DNA, Vol. 3, No. 6, 479-488 (1984). Η μέθοδος περιγράφεται εν συντομία ακολούθως, και περιγράφεται πλήρως στο Παράδειγμα 1.

Το γονίδιο λιπάσης, απομονωμένο από το πλασμίδιο έκφρασης, εισάγεται σε ένα κυκλικό βιακτηριοφάγο φορέα M13. Σε ένα μονόκλωνο γονιδίωμα, ανασυνδέται ένας χημικά παρασκευασμένος συμπληρωματικός κλώνος DNA. Αυτός ο κλώνος DNA περιέχει την προς ένθεση μεταλλαγή ανάμεσα σε αλληλουχίες συμπληρωματικές στις αλληλουχίες λιπάσης στο κυκλικό DNA. Ο εκκινητής (έναιμα) ακολούθως εκτείνεται in vitro σε ολόκληρο το μήκος του κυκλικού γονιδιώματος βιοσχηματικά με τη χρήση πολυμεράτης Klenow. Όταν μεταμορφωθεί στην E. coli, το ετερόδιπλο θα δημιουργήσει το δίκλωνο DNA με την επιθυμητή αλληλουχία από την οποία μπορεί να απομονωθεί ένα θραύσμα και να επανειστρέψει εντός του πλασμίδιου έκφρασης.

Μια άλλη μέθοδος που εφαρμόστηκε περιγράφεται υπό Nelson & Long, Analytical Biochemistry, 180, 147-151 (1989). Αυτή περιλαμβάνει την δημιουργία σε 3 στάδια ενός θραύσματος PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράτης) που περιέχει την επιθυμητή μεταλλαγή που εισάγεται με τη χρήση χημικά παρασκευασμένου κλώνου DNA ως ένα από τους εκκινητές στις αντιδράσεις PCR. Από το δημιουργηθέν μέσω PCR θραύσμα, μπορεί να απομονωθεί μέσω διάσχισης με περιοριστικά ένζυμα ένα θραύσμα DNA που φέρει μια μεταλλαγή και επανεισάγεται στο πλασμίδιο έκφρασης. Αυτή η μέθοδος περιγράφεται πλήρως στο Παράδειγμα 3. Η μέθοδος περιτερώ απεικονίζεται στις Εικόνες 3 και 4.

Σε μια περαιτέρω μέθοδο, που συνήθως ορίζεται «μεταλλαξιγένειη σκαστίτις», αντικαθίσταται ένα τμήμα μεταξύ δύο θέσεων περιορισμού της περιοχής που καθίκοτεί τη λιπάση μέσω ενός συνθετικού θραύσματος DNA που φέρει την επιθυμητή μεταλλαγή.

Παράδειγμα 1:

Κατασκευή ενός πλασμίδιου που εκφράζει την παραλλαγή D96L της λιπάσης *Humicola lanuginosa*

Απομόνωση του γονιδίου λιπάσης:

Το πλασμίδιο έκφρασης p960 περιλαμβάνει την κωδικοποιητική περιοχή για τη λιπάση *Humicola lanuginosa* σε ένα θραύσμα περιορισμού BamHI/XbaI (το DNA και η αλληλουχία αμινοξέων της λιπάσης απεικονίζονται στην Καταχώρηση Αλληλουχίας ID No. 1). Το θραύσμα BamHI/XbaI απομονώθηκε ως αιωλούθιας: το πλασμίδιο έκφρασης επωάστηκε με τις ενδονουκλεάσεις περιορισμού BamHI και XbaI. Οι συνθήκες ήταν: 5 μ.γρ. πλασμίδιον, 10 μονάδες BamHI, 10 μονάδες XbaI, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl₂ και 1 mM DTT σε δύκο 50 μ.λτ. Η θερμοκρασία ήταν 37 °C και ο χρόνος αντίδρασης 2 ώρες. Τα δύο θραύσματα διατηρήστηκαν σε πηκτή αγρόδης 1% και το επιθυμητό θραύσμα απομονώθηκε από την πηκτή.

Σύνδεση με το φορέα M13mp18:

Χωνεύτηκε ο βιακτηριοφάγος φορέας M13mp18 στη δίκλωνη αντιγραφική μορφή αυτού με BamHI και XbaI υπό τις ανωτέρω συνθήκες. Το απομονωθέν θραύσμα περιορισμού συνδέθηκε στο χωνευμένο βιακτηριοφάγο φορέα στο ακόλουθο μίγμα αντίδρασης: Θραύσμα 0,2 μ.γρ., φορέας 0,02 μ.γρ., 50 mM Tris-HCl, πεχά 7,4, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT και 1 mM ATP σε δύκο 20 μ.λτ. στους 16 °C επί 3 ώρες. Μεταμορφώθηκαν 5 μ.λτ. αυτού του μίγματος στο στελέχος JM101 της E. coli. Η παρουσία του θραύσματος εντός του φορέα εξαχριβώθηκε με τενάλυση περιοριστικού ενζύμου στο απομονωθέν δίκλωνο M13-DNA από τους μεταμορφωμένους πύπους.

Απομόνωση του μονόκλωνου (ss) DNA (μήτρα):

Από τους μεταμορφωμένους τύπους που περιγράφηκαν παραπάνω, απομονώθηκε το ss-DNA σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε υπό Messing στο Gene, 19, 269-276 (1982).

5' φωτιφούμενή πλάκα του εκκινητή μεταλλαξιγένεσης:

Φυσισφορυλιώθηκε ο εκκινητής μεταλλαξιγένεσης με την αλληλουχία 5'-TTTCTTTCAACAAGAAGTTAAGA-3' στο τέλος της 5' εντός μίγματος αντιδραστής 30 μ.λ.τ. περιέχοντος 70 mM Tris-HCl, πεχά 7, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT και 1 mM ATP, 100 pMol ολυγονουκλεοτιδίου και 3,6 μονάδες πολυνουκλεοτιδίου κινάσης T4. Η αντιδραση εκτελέστηκε επί 30 λεπτά στους 37°C. Ακολούθως, το ένζυμο αδυνατούμηθηκε με επύσιση του μίγματος επί 10 λεπτά στους 65°C.

Ανασύνδεση της μήτρας και φωτιφορυλιωμένην εκκινητή μεταλλαξιγένεσης:

Η ανασύνδεση της μήτρας και του εκκινητή εκτελέστηκε εντός δύκου 10 μ.λ.τ. περιέχοντος 0,5 pMol μήτρας, 5 pMol εκκινητή, 20 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl και 1 mM DTT με θέρμανση επί 10 λεπτά στους 65°C και ακόλουθη ψύξη στους 0°C.

Αντιδραση επέκτασης/πύνδεσης:

Στο σιντερό μίγμα αντιδραστής, προστέθηκαν 10 μ.λ.τ. του ακόλουθου μίγματος: 0,3 mM dATP, 0,3 mM dCTP, 0,3 mM dGTP, 0,3 mM TTP, 1 mM ATP, 20 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 3 μονάδες λιγκίσης T4 DNA και 2,5 μονάδες πολυμεράσης Klenow. Ακολούθως, η αντιδραση εκτελέστηκε επί 16 ώρες στους 16°C.

Μεταμόσφωση του JM101:

Το ανιοτέρω μίγμα αντιδρασης μεταμόσφωθηκε σε διάφορες αραιώσεις εντός κατεργασμένων με CaCl₂ κυτάρων JM101 της E.coli με τη χρήση πρόστυπων τεχνικών και καλλιεργήθηκαν σε άνω πλάκες άγαρ 2 x YT σε πλάκες άγαρ 2 x YT (2 x YT = τρυπιάνη 16 γρ./λτ., εκχύλισμα ζυμομύκητα 10 γρ./λτ., NaCl 5 γρ./λτ. Προστέθηκε 2 x YT άνω άγαρ = 2 x YT με σγαρδή 0,4% και φέρθηκε σε αυτόκλειστο. Προστέθηκαν πλάκες άγαρ 2 x YT = 2 x YT με άγαρ 2% και φέρθηκαν σε αυτόκλειστο).

Οι πλάκες επωάστηκαν ολονυκτίως στους 37°C.

Εξακρίβωση των θετικών κλωνών:

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν υβριδοποίηση σε κεκλιμένη πλάκα η οποία περιγράφεται ως ακολούθως: Φέρθηκε ένας ηθμός νιτροκυαπίνης σε μια πλάκα με κατάλληλη πυκνότητα πλάκας, έτσι ώστε να διαβρέχεται ο ηθμός. Ακολούθως ο ηθμός φέρθηκε σε λουτρό στα ακόλουθα διαλύματα: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH επί 30 δευτερόλεπτα, 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, πεχά 8 επί 1 λεπτό και 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M κιτρικό νάτριο) για μεταγενέστερη χρήση. Ο ηθμός ξηρανθήκε σε διηθητικό χαρτί 3 MM και ψήθηκε επί 2 ώρες στους 80°C σε φούρνο κενού.

Ο εκκινητής μεταλλαξιγένεσης με την αλληλουχία 5'-TTTCTTTCAACAAGAAGTTAAGA-3' ραδιοιστημάνθηκε στο 5' άκρο εντός δύκου 30 μ.λ.τ. περιέχοντος 70 mM Tris-HCl, πεχά 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10 pM ολυγονουκλεοτίδιο, 20 pM γ-32P-ATP και 3,5 μονάδες πολυνουκλεοτίδιο κινάσης T4. Το μίγμα επωάστηκε στους 37°C επί 30 λεπτά και ακολούθως επί 5 λεπτά στους 100°C.

Ο ξηρανθείς ηθμός υβριδώθηκε προκαταρτικά επί 2 ώρες στους 65°C σε 6 x SSC, 0,2% βόεια οροσαλβουμάνη, 0,2% Ficoll, 0,2% πολυβινυλοπυροξολιδηνή, 0,2% διαδεκυλωτικό νάτριο (SDS) και 50 μ.γρ./λιτρό. DNA σπέρμιατος σολωμού κατεργασμένο με υπερήχους. Ακολούθως, το περιέχον το σημασιέντο ανιχνευτή μίγμα αντιδραστής προστέθηκε σε 15 χλστ. φρέσκου μίγματος προκαταρκτικής υβριδώσης, και ο ηθμός φέρθηκε εντός αυτού ολονυκτίως στους 27°C με ήπια ανακίνηση. Μετά την υβριδώση, ο ηθμός ξεπλύθηκε 3 φορές κάθε φορά επί 15 λεπτά σε 2 x SSC, 0,1% SDS και αυτοδιαδιογραφήθηκε. Μετά το ξέπλυμα στο ίδιο διάλυμα, αλλά τώρα στους 50°C, και με άλλη αυτορραδιογραφία, εξακριβώθηκαν οι πλάκες οι περιέχουσες αλληλουχίες DNA συμπληρωματικές του εκκινητή μεταλλαξιγένεσης.

Επειδή ο εξακριβωμένος κλώνος είναι αποτέλεσμα ενός ετερόδιπλου, η πλάκα καλλιεργήθηκε πάλι. Επαναληφθηκαν τα στάδια υβριδώσης και εξακρίβωσης.

(ιωαυροπημένη με Tris-HCl, πεχά 7,5) και κατακρημνίστηκε με πυρυτηγή 2 ώγκων παγιοπυχύμενης αιθανούλης 96%. Μετά από φυγοκέντρηση και ξήρανση του σφιαλίου, το γραμμωποιημένο DNA διαιλύθηκε εντός 50 μλτ. ύδαιτος και η συγκέντρωση υπολογίστηκε σε πρκτή αγαρδζής.

5 **Μεταλλαξιγένεση σε 3 στάδια PCR:**

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, η 3 στιδών μεταλλαξιγένεση περιλαμβάνει τη χρήση τευτάρων εκκινητών:

Εκκινητής μεταλλαξιγένεσης: (=A): 5'-GTGCGCAGGGATGTCGGAATGTTAGG-3'

Βοηθός PCR 1 (=B): 5'-GGTCATCCAGTCAGTGAGACCCCTCTACCTTAAATCGGC-3'

Βοηθός PCR 2 (=C): 5'-CCATGGTTTACCGGTGTCT-3'

10 Λάβη PCR (=D): 5'-GGTCATCCAGTCAGTGAGAC-3'

Τα 3 στάδια εκτελέστηκαν με το ακόλουθο ρυθμιστικό το οποίο περιέχει: 10 mM Tris-HCl, πεχά 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001% ζελατίνη, 0,2 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM TTP, 2,5 μονάδες πολυμεράσης Taq.

15 Στο στάδιο 1, προστέθηκαν 100 pMol εκκινητή A, 100 pMol εκκινητή B και 1 fMol γραμμωποιημένου πλασμιδίου σε ένα σύνολο από 100 μλτ. μίγματος αντίδρασης και εφαρμόστηκαν 15 κύκλοι των 2 λεπτών στους 95°C, των 2 λεπτών στους 37°C και των 3 λεπτών στους 72°C.

20 Η συγκέντρωση του προϊόντος PCR εκτιμήθηκε σε πρκτή αγαρδζής. Ακολούθως, εκτελέστηκε το στάδιο 2. Περιελήφθηκαν 0,6 pMol προϊόντος του σταδίου 1 και 1 fMol γραμμωποιημένου πλασμιδίου σε ένα σύνολο από 100 μλτ. του ανωτέρου πιναφερθέντος ρυθμιστικού και εφαρμόστηκε 1 κύκλος από 5 λεπτά στους 95°C, 2 λεπτά στους 37°C και 10 λεπτά στους 72°C.

25 Στο μίγμα αντίδρασης του σταδίου 2, προστέθηκαν 100 pMol εκκινητή C και 100 pMol εκκινητή D (καθένα 1 μλτ.) και εφαρμόστηκαν 20 κύκλοι των 2 λεπτών στους 95°C, των 2 λεπτών στους 37°C και των 3 λεπτών στους 72°C. Αντός ο χειρισμός περιελάμβανε το στάδιο 3 στη διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης.

25 **Απομόνωση του μεταλλαγμένου θραύσματος περιορισμού:**

Το προϊόν από το στάδιο 3 απομονώθηκε από πρκτή αγαρδζής και διαιλύθηκε ξανά σε 20 μλτ. ύδατος. Ακολούθως, χωνεύτηκε με το περιοριστικό ένζυμο BspMII σε συνυλικό δγκ 50 μλτ. με την ακόλουθη σύνθεση: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, πεχά 7,9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT και 10 μονάδες BspMII. Εκτελέστηκε επώαση στους 37°C επί 2 ώρες. Το θράυσμα 264 bp BspMII απομονώθηκε από μια πρκτή αγαρδζής.

30 **Σύνδεση στο φορέα έκφρασης pAHL:**

Το πλασμίδιο έκφρασης pAHL διασήστηκε με BspMII υπό τις ανωτέρω συνθήκες και απομονώθηκε το μεγάλο θραύσμα από μια πρκτή αγαρδζής. Το απομονωθέν μεταλλαγμένο θραύσμα ως ανωτέρω συνδέθηκε με αυτόν το φορέα, και το μίγμα σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε προς μεταμόρφωση της E. coli. Η παρουσία και ο προσανατολισμός του θραύσματος επιβεβαιώθηκε μέσω διάσχισης ενός παραπενάσματος πλασμιδίου από ένα τύπω μεταμόρφωσης με περιοριστικά ένζυμα. Η ανάλυση αλληλουχίας εκτελέστηκε στο δίκλωνο πλασμίδιο με τη χρήση της μεθόδου τερματισμού της διδεξίν αλυσίδας που ανέπτυξε ο Sanger. Το πλασμίδιο σονομάστηκε pAHLD254N και είναι απαράλλακτο με το pAHL, εκτός από το αλλαγμένο κωδικόνιο.

40 **Παράδειγμα 4: Κατασκευή των πλασμιδών που εκφράζουν άλλες παραλλαγές της λιπάστρης *Humicola*.**

Οι ακόλουθοι μεταλλαγμένοι τύποι κατασκευάστηκαν με την ίδια μέθοδο δπως περιγράφηκε στο Παράδειγμα 3, εκτός από τη χρήση άλλων περιοριστικών ενζύμων για τη χώνευση του PCR-προϊόντος και ο φορέας χρησιμοποιήθηκε για την επανακλωνοποίηση του μεταλλαγμένου θραύσματος. Τα ονόματα των πλασμιδών και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις τριποποιήσεις έχουν ως κατατέθη.

45

	Όνομα πλασμαδίου	Αλληλουχία εκκινητή Α
5	pAHLD254K	5'-GTGCCAGGGATCTCGGAATGTT-3'
	pAHLD254R	5'-GTGCCAGGGATTCTCGGAATGTT-3'
	pAHLD242N	5'-GCCGCCGGTGGCGTTGATGCCCTCTAT-3'
	pAHLD242N/D254N	5'-GTGCCAGGGATGTCGGAATGTTAGGCTGGTTATTGCCG- CCGGTGGCGTTGATGCCCTCTAT-3'
10	pAHLE87R	5'-CCCGATCCAGTTCTTATCGATCGAGAGCCGCCG-3'
	pAHLE87K	5'-CGATCCAGTTCTTATCGATCGAGAGGCCACGG-3'

Πάραδειγμα 5: Κατασκευή των παραλλαγών λιπάσης μέσω συνδυασμού των διαθέσιμων μεταλλαγμένων τύπων:

Οι ακόλουθοι μεταλλαγμένοι τύποι κατασκευάστηκαν μέσω συνδυασμού των θραυσμάτων πλασμαδίου των μεταλλαγμένων τύπων που κατασκευάστηκαν ανωτέρω. Για πιο δειγμα, ο pAHLE87K/D254K κατασκευάστηκε μέσω απομόνωσης του τμήματος περιορισμού BamHI/BstXI από τον pAHLE87K και την εισαγωγή του θραυσματος στον pAHLD254K που χωνεύτηκε με BamHI και BstXI:

	Πλασμαδίο
15	pAHLE87K/D254K
	pAHLE87Q/D254N/D242N/E210Q
	pAHLE87Q/D242N/E210Q
20	pAHLR209A/E210A/D96L
	pAHLR209A/E210Q/E56Q
	pAHLE210Q/D242N/D254N
	pAHLE87Q/E210Q//D242N

Παράδειγμα 6:

Μεταμόρφωση του *Aspergillus oryzae* (γενική διαδικασία)

Ενοφθαλμίστηκαν 100 χλστλ. YPD (Sherman et al., Methods in Yeasts Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) με σπόρια από A. oryzae και επωάστηκαν με ανακίνηση επί περίπου 24 ώρες. Το μυκήλιο συλλέχθηκε με διήθηση μέσω miracloth και ξεπλύθηκε με 200 χλστλ. 0,6 M MgSO₄. Το μυκήλιο αιωρήθηκε εντός 15 χλστλ. από 1,2 M MgSO₄, 10 mM NaH₂PO₄, πεχά = 5,8. Το αιώρημα ψύχθηκε σε πάγο και προστέθηκε 1 χλστλ. ρυθμιστικού περιέχοντος 120 χλστγ. από Novozym 234, φουρνιάς 1687. Μετά από 5 λεπτά, προστέθηκε 1 χλστλ. από 12 χλστγ./χλστλ. BSA (Sigma τύπος H25) και η επώαση συνεχίστηκε με ήπια αιάδευση επί 1,5-2,5 ώρες στους 37°C ώστου στο επιθεωρηθέν δείγμα στο μικροσκόπιο έγινε ορατός ένας μεγάλος αριθμός από πρωτοπλάστες.

35 Το αιώρημα διηθήθηκε μέσω miracloth, το διηθημα φέρθηκε στη αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα και επικαλύφθηκε με 5 χλστλ. από 0,6 M σορβιτόλη, 100 mM Tris-HCl, πεχά = 7. Εκτελέστηκε φυγοκέντρηση επί 15 λεπτά σε 1.000 g και οι πρωτοπλάστες συλλέχθηκαν από την κορυφή του προσκέφαλου MgSO₄. Προστέθηκαν 2 δγκοι STC (1,2 M σορβιτόλη, 10 mM Tris-HCl, πεχά = 7,5, 10 mM CaCl₂) στο αιώρημα του πρωτοπλάστη και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε επί 5 λεπτά σε 1.000 g. Το σφαιρίδιο του πρωτοπλάστη επαναιωρήθηκε σε 3 χλστλ. STC και επανασφαιριστούθηκε. Επαναλήφθηκε αυτή η διαδικασία. Τελικώς, οι πρωτοπλάστες επαναιωρήθηκαν σε 0,2-1 χλστλ. STC.

40 Αναμόχθηκαν 100 μ.λτ. από το αιώρημα του πρωτοπλάστη με 5-25 μ.γρ. p3SR2 (ένα γονίδιο amdS A. nidulans που φέρει το περιγραφόμενο πλασμάδιο υπό Hynes et al., Mol. and Cel. Biol., Vol. 3, No. 8, 1430-1439, Αύγουστος 1983) σε 10 μ.λτ. STC. Το μίγμα αφέθηκε στη θερμοκρασία δωματίου (Θ.Δ.) επί 25 λεπτά και προστέθηκαν και αναμόχθηκαν προσεκτικά (δύο φορές) 0,2 χλστλ. από PEG 4000 60% (BDH 29576), 10 mM CaCl₂ και 10 mM Tris-HCl, πεχά = 7,5 και τελικάς προστέθηκαν 0,85 χλστλ. του ίδιου διαλύματος και αναμόχθηκαν προσεκτικά. Το μίγμα αφέθηκε στη Θ.Δ. επί 25 λεπτά, περιδινήθηκε σε 2.500 g επί 15 λεπτά και το σφαιρίδιο επαναιωρήθηκε σε 2

χλοτλ. πορθμητόλης 1.2 M. Μετά από μία ακόμα κατευρήμανση ωι πρωτινπλάμπες απλωθηκαν σε ελαχιστες πλίκες (Cove, Biochem. Biophys. Acta 113 (1966) 51-56) περιέχουσιες 1 M σουκρόζης, πεχά = 7, 10 mM αικετικόδιο ως πηγή αζώτου και 20 mM CsCl προς ανιωτολή της ανάπτυξης υποβάθμου. Μετά από επώνιση επί 4-7 ημέρες στους 37°C συλλέχθηκαν τα απόρια, αιωρήθηκαν εντός στερέου ύδατος και απλώθηκαν σε μονιμοκές αποικίες. Αυτή η μέθοδος επαναλήφθηκε και τα απόρια μιας μονιμοκές αποικίας αποθηκεύθηκαν μετά τη δεύτερη επανεπομόνωση ως ένας προσδιορισμένος μεταμορφωμένος τύπος.

Παράδειγμα 7

Έκφραση της παραλλαγής λιπάσης D96L εντός A. oryzae

10 Ο pAHLD96L μεταμορφώθηκε σε A. oryzae IFO 4177 μέσω συν-μετικραφωσης με p3SR2 περιέχοντα το γονίδιο amdS από τον A. nivalans όπως περιγράφεται στο Παράδειγμα 15. Οι παρασκευισθέντες ωι ανιωτέρω πρωτοπλάστες επωάστηκαν με ένα μύγμα από ίσες ποσότητες pAHLD96L και p3SR2, με τη χρήση περόπου 5 μ.γρ. από το καθένα. Επαναπομονώθηκαν δύο φορές 9 μεταμορφωμένοι τύποι οι οποίοι μπορούσαν να χρησιμοποιήσουν ακεταμίδιο ως μόνη πηγή αζώτου. Μετά την ανάπτυξη σε YPD επί τρεις ημέρες, τα υπερχείμενα καλλιέργειας αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τον προσδιορισμό της δραστικότητας λιπάσης δημοπρατήσαται στο Παράδειγμα 16 (Καθαρισμός των παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης). Ο καλύτερος μεταμορφωμένος τύπος επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτες και αναπτύχθηκε επί 4 ημέρες στους 30°C σε μια φιάλη ανακίνησης 1 λ. σε μέσο 200 χλοτλ. FG4 (3% άλευρο σόγιας, 3% μαλτοδεξτρίνη, 1% πεπτόνη, το πεχά ρυθμίστηκε σε 7 με 4 M NaOH). Υπό αυτές τις συνθήκες ο μεταμορφωμένος τύπος απέδωσε περόπου 500 μονάδες λιπάσης ανά χλοτλ. καλλιέργειας.

15 20 Οι άλλες παραλλαγές λιπάσης παράχθηκαν κυρίως όπως περιγράφηκε ανωτέρω, με τη χρήση της γενικής διαδικασίας που περιγράφηκε στο Παράδειγμα 6.

Παράδειγμα 8

Καθαρισμός των παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης

25 Προσδιορισμός της δραστικότητας λιπάσης:
Παρασκευαστήκε ένα υπόστρωμα για λιπάση μέσω γαλακτωματοποίησης τριβουτυρικής γλυκερίνης (MERCK) με τη χρήση αραβικού κόρμων ως γαλακτωματοποιητή.
Η δραστικότητα της λιπάσης προσδιορίστηκε σε πεχά 7 με τη χρήση της μεθόδου στατ. πεχά. Ορίστηκε μια μονάδα δραστικότητας λιπάσης (LU/χλοτλ.) ως η αναγκαία ποσότητα για την απελευθέρωση ενός μ.Μοι λιπαρού οξέος ανά λεπτό.

30 Στάδιο 1: Φυγοκεντρείται το υπερχείμενο ζύμωσης, απορρίπτεται το ίζημα. Ρυθμίζεται το πεχά του υπερχείμενου σε 7 και προστίθεται σταδιακά ίσος όγκος ψυχρής αιθανόλης 96 %. Αφήνεται το μύγμα σε ηρεμία επί 30 λεπτά εντός παγολούτρου. Φυγοκεντρείται και απορρίπτεται το ίζημα.

35 Στάδιο 2: Ιοντοανταλλακτική χρωματογραφία. Διηθείται το υπερχείμενο και φέρεται σε στήλη ταχείας ροής DEAE (Pharmacia TM) ισορροπημένη με 50 mM τρις-οξεικό ρυθμιστικό πεχά 7. Ξεπλένεται η στήλη με το ίδιο ρυθμιστικό μέχρι η απορρόφηση στα 280 nM να είναι μικρότερη από 0,05 OD. Εκλούνεται η δεσμευμένη ενζυμική δραστικότητα με γραμμική βαθμίδωση άλατος εντός του ίδιου ρυθμιστικού (0 έως 0,5 M NaCl) με τη χρήση άγκων πέντε στηλών. Συλλέγονται τα τιμήματα που περιέχουν την ενζυμική δραστικότητα.

40 Στάδιο 3: Υδρόφοβη χρωματογραφία. Ρυθμίζεται η γραμμομοριακότητα της δεξαμενής που περιέχει την ενζυμική δραστικότητα σε 0,8 M με πρωτήρη στερεού οξεικού αιματού. Φέρεται το ένζυμο σε στήλη πηκτής TSK Butyl-Tyogopearl 650 C (διαθέσιμη από την Tosoh Corporation Japan) η οποία εξισορρωπήθηκε προκαταρκτικά με 0,8 M οξεικό αιματού. Ξεπλένεται το μη συνδεθέν υλικό με 0,8 M οξεικό αιματού και εκλούνεται το δεσμευμένο υλικό με αποσταγμένο ύδωρ.

45 Στάδιο 4: Εκλούνεται με ύδωρ η δεξαμενή που περιέχει τη δραστικότητα λιπάσης προς ρύθμιση της αγιωγμότητας σε 2 mM και πεχά σε 7. Φέρεται η δεξαμενή σε στήλη σεφαρμάζης υψηλής απόδυσης Q (Pharmacia) εξισορροπημένης προκαταρκτικά με 50 mM τρις-οξεικό ρυθμιστικό πεχά 7. Εκλούνεται το δεσμευμένο ένζυμο με γραμμική βαθμίδωση άλατος.

Παραίδειγμα 9

Απόδοση στο πλύσιμο των παραλλαγών λιπάσης της εφεύρεσης

Η απόδοση στο πλύσιμο των παραλλαγών λιπάσης Humicola lanuginosa της εφεύρεσης εκτιμήθηκε με βάση τη δουσολογία ενδύμου σε χλοτγρ. πρωτεΐνης ανά λίτρο σύμφωνα με την OD₂₈₀ σε σύγκριση με τον άγριο τύπο λιπάσης H. lanuginosa.

5 Εκτελέστηκαν δοκιμές πλυσίματος σε ποτήρια ζέσεως των 150 χλστλ. θερμοστατημένα εντός υδρολούτρου. Τα ποτήρια ζέσεως αναδεύτηκαν με τριγυνικές μαγνητικές ψάριδους.

Οι πειραματικές συνθήκες ήταν ως κάτωθι:

10 Μέθοδος: 3 κύκλοι με ολονύκτια ξήρανση μεταξύ κάθε κύκλου

Yγρό πλυσίματος: 100 χλστλ. ανά ποτήρι ζέσεως

Υφασμάτινο παρένθεμα: 6 παρενθέματα (3,5 X 3,5 cm) ανά ποτήρι ζέσεως

Υφασματικά: Βάμβακας 100%, Test Fabrics Style #400

Χρώση: Χρωματισμένο λαρδί με ερυθρό των Σουδάν (0,75 χλστγρ. χρωστική/γρ. λαρδιού).

15 Εφαρμόστηκαν 6 μ.λτ. λαρδιού θερμάνθεντος στους 70°C στο κέντρο κάθε παρενθέματος. Μετά την εφαρμογή της χρώσης, τα παρενθέματα θερμάνθηκαν σε φούρνο στους 75°C επί 30 λεπτά. Τα παρενθέματα ακολούθως αποθηκεύθηκαν ολονυκτίως στη Θ.Δ. πριν από το πρώτο ξέπλυμα.

Απορρυπαντικό: LAS (Nansa 1169/P, 30% a.m.) 1,17 γρ./λτ.

ΑΕΟ (Dobanol 25-7) 0,15 γρ./λτ.

Τριφωσφορικό νάτριο 1,25 γρ./λτ.

20 Θειικό νάτριο 1 γρ./λτ.

Ανθρακινό νάτριο 0,45 γρ./λτ.

Πυριτικό νάτριο 0,15 γρ./λτ.

Πεχά 10,2

Συγκέντρωση λιπάσης: 0,075, 0,188, 0,375, 0,75, και 2,5 χλστγρ. πρωτεΐνης λιπάσης ανά λίτρο

25 Χρόνος: 20 λεπτά

Θερμοκρασία: 30°C

Πλύσιμο: 15 λεπτά σε τρεχούμενο πόσιμο νερό

30 Εξήρανση: ολονυκτίως στη Θ.Δ. (περίπου στους 20°C, σχετ. υγρασία 30-50%)

Αξιολόγηση: μετά το 3ο πλύσιμο, μετρήθηκε ο βαθμός ανακλασης στα 460 nm.

30

Αποτελέσματα

Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης συγκρίθηκαν για τις παραλλαγές λιπάσης και της φυσικής λιπάσης H. lanuginosa. Οι καμπύλες δόσης-απόκρισης υπολογίστηκαν με πρωτογενή των δεδομένων μέτρησης στην ακόλουθη εξίσωση:

35

$$\Delta R = \Delta R_{μεγ.} \frac{C^{0.5}}{K + C^{0.5}} \quad (I)$$

40 δύον

το ΔR είναι το εκφραζόμενο αποτέλεσμα σε μονάδες ανακλαστικότητας το C είναι η συγκέντρωση του ενζύμου (χλστγρ/λτ.)

το $\Delta R_{μεγ.}$ είναι μια σταθερά που εκφράζει το μέγιστο αποτέλεσμα

το K είναι μια σταθερά το K^2 εκφράζει συγκέντρωση ενζύμου στην οποία λαμβάνεται το μεγάλο του μεγίστου αποτελέσματος.

45

Υπολογίστηκαν οι πιθανώντες βελτίωσης, με βάση τις χιωακτηριστικές παθερές $\Delta R_{μγ}$ και K που βρέθηκαν για κάθε παραλλαγή λιπάσης όπως επίσης και για τη λιπάνη άγριου τύπου. Ο παραγόντας βελτίωσης, ορίζεται ως εξής:

$$5 \quad f_{βελτιωσης} = C_{WT}/C \quad (II)$$

εκφράζει την ποσότητα πιθανής της παραλλαγής λιπάσης που χρειάζεται για τη λήψη του ίδιου αποτελέσματος δύναμης αντίστασης με 0,25 χλοπγρ./λτ. με συναφορά στην πρωτείνη άγριου τύπου (C_{WT}).

10 Έτσι, η διαδικασία για τον υπολογισμό των παραγόντων βελτίωσης είναι ως παρακάτω:

1) Το αποτέλεσμα της πρωτείνης άγριου τύπου στα 0,25 χλοπγρ/λτ. ($\Delta R_{αγριας πιπας}$) υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης (I):

2) Η συγκέντρωση της παραλλαγής λιπάσης που προκύπτει από το ίδιο αποτέλεσμα δύναμης αυτή του άγριου τύπου στα 0,25 χλοπγρ/λτ. υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εκάλουσθης εξίσωσης:

$$15 \quad C = \left(K_{(παραλλαγη)} \frac{\Delta R_{αγριας πιπας}}{\Delta R_{μγ. (παραλλαγη)} - \Delta R_{(αγριας πιπας)}} \right)^2 \quad (III)$$

3) ο παραγόντας βελτίωσης υπολογίστηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης (II).

20 Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στον ακόλουθο Πίνακα I

Πίνακας I

	Παραλλαγή	Παραγόντας βελτίωσης
25	D96L	4,4
	D111L	1
	E87A	1
30	E56A	1,6
	E56Q	2,6
	R209A	1,1
	D242N	1,7
	R209A + E210A	1,9
35	R209A + E210A + D96L	2,8
	E210Q + D242N + D254N	1,8
	R209A + E210A + D96L + E56Q	1,5

40 Από τον Πίνακα 1 φαίνεται ότι οι παραλλαγές λιπάσης R209A + E210A, E56Q και D96L έχουν μια σημαντικά καλύτερη απόδοση πλυσίματος από την λιπάση άγριου τύπου. Αυτό πιθανώς να αποδίδεται στο μειωμένο αρνητικό φορτίο και στην αυξημένη υδροφοβία αυτών των παραλλαγών που προκύπτει από την αυξημένη απωρρόφηση κατά τη διάρκεια του πλυσίματος και συνεπώς υψηλότερη δρυστικότητα κατά τη διάρκεια της φάσης του στεγνύματος. Η απόδοση των παραλλαγών λιπάσης E87A, D111L και R209A είναι ίση με αυτή του ενδύμου άγριου τύπου.

45

Παράδειγμα 10

Αυξημένη θερμική ευστάθεια των παραλλαγών λιπασμάτων

Η θερμική ευστάθεια των επιλεγμένων παραλλαγών της λιπασμής *H. lanuginosa* έχει εξεταστεί με Διαφορική Θερμοδομετρία Σάρωσης (DSC). Με τη χρήση αυτής της τεχνικής, η θερμοκρασία θερμικής μετουσίωσης, Td, και θορίζεται με θέρμανση ενδέ διαλύματος ενζύμου σε σπαθερά προγραμματισμένο ρυθμό.

Πειράματα:

Για τις έρευνες χρησιμοποιήθηκε ο θερμοδομετρητής Διαφορικής Σάρωσης MC-2D από την MicroCal Inc. Παρασκευαστήκαν ρυθμιστικά διαλύματα 50 mM στις ακόλουθες τιμές πεχά: 4 (οξικό), 7 (TRIS-οξικό), 10 (γλυκίνη).

Η σύγκεντρωση του ενζύμου κυμαίνεται από 0,6 έως 0,9 χλστγρ./χλστλ., και μια συνολική ποσότητα χρησιμοποιήθηκε από περίπου 1,2 χλστλ. για κάθε πείραμα. Όλα τα δείγματα θερμάνθηκαν από 5°C έως 95°C με ένα ρυθμό σάρψωσης 90°C/ώρα.

Αποτελέσματα:

Τα αποτελέσματα για τον άγριο τύπο και τους επιλεγμένους μεταλλγμένους τύπους απεικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Αρ.	Μετάλλαξη	πεχά 4		πεχά 7		πεχά 10	
		Td	dTd	Td	dTd _d	Td	dTd
WT	—	58,9	—	74,7	—	69,3	—
1	F211A	60,2	+1,3	75,8	+1,1	70,3	+1
2	T267R	59,4	+0,5	75,7	+1	70	+0,7
3	D111N	58,3	-0,6	75,6	+0,9	69,9	+0,6
4	F211L	57,8	-1,1	74,8	0,1	69,4	0,1

Σημείωση: το dTd υποδηλώνει την αλλαγή στη θερμική ευστάθεια ως αποτέλεσμα της μεταλλαγής.

Παράδειγμα 11

Σταθερότητα κατά την απόθήκευση των παραλλαγών λιπασμάτων *H. lanuginosa* εντός υγρού απορυπαντικού Δοκιμάστηκαν μερικές παραλλαγές εντός πρότυπου υγρού απορυπαντικού με την ακόλουθη σύνθεση:

		% w/w
Ανιοντικός	LAS	10
	AS	1
35	Σάντωνας	14
Μη ιοντικός	ΑΕΟ	13
Διαλύτης	1,2-προπανοδιόλη	3
	Αιθανόλη	5
40	Ρυθμιστικό	6
Σώμα	κιτρικό νάτριο	1
Μέσο εξουδετέρωσης	NaOH	2
Σταθεροποιητής κτ.λ.	SXS	1
	Ca ²⁺	0,0025
	φωσφονικά	0,4
45	Na ₂ SO ₄	0,2
Υδωρ	προστιθέμενο έως 100%	
Πεχά	8 ή 10	

Πρωτεύουσαν 1.000 LU/γρ. απορρυπαντικού και σε μερικά δείγματα προστείχαν 0,25 AU/γρ. (Alcalase[®]). Ήταν δείγματα αποθηκεύτηκαν σύμφωνα με το ακόλουθο υγήμα (το και ήταν εις τριπλούν)

	Θερμοκρασία αποθήκευσης:	-18°C	30°C
5	Απορρυπαντικό		
	πεχά 8, χωρίς πρωτεάση	2 & 7 ημέρες	2 & 7 ημέρες
	πεχά 8, 0,025 AU/γρ.		2 ημέρες
	πεχά 10, χωρίς πρωτεάση	7 ημέρες	7 ημέρες

10 Εφαρμόζοντας αυτή την επώαση τα δείγματα αναλύθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο LU (Novo Nordisk AF 95,5).

Υποθέτοντας ότι η διάσπαση της δραστικότητας λιπάντης ακολουθεί μια κινητική αντιδρασης πρώτης τάξης, η σταθερά της ταχύτητας διάσπασης μπορεί να προσδιοριστεί ως εξής:

$$A(t) = A_0 \cdot \exp(-k \cdot t)$$

15 το $A(t)$ είναι η δραστικότητα ενζύμου σε χρόνο t , το A_0 είναι η αρχική δραστικότητα και το k η σταθερά ταχύτητας αντιδρασης πρώτης τάξης.

Για το απορρυπαντικό που περιλαμβάνει πρωτεάση μπορεί να υπολογιστεί μια σταθερά ταχύτητας για την πρωτεόλυση από τη σχέση

20 $A(t) = A_0 \cdot \exp(-[k + k_p] \cdot t)$

όπου το k_p είναι η σταθερά ταχύτητας της πρωτεόλυσης, και όπου το k υπολογίζεται από τα δεδομένα σταθερότητας που προσδιορίστηκαν για το απορρυπαντικό χωρίς πρωτεάση.

25 Σε κάθε πείραμα, η λιπάση άγριου τύπου H. lanuginosa περιελήφθει ως αναφορά, και η σύγχριση των προαλλαγών με αυτές του άγριου τύπου έγινεν μόνο εντός του πειράματος για να μειωθεί η αβεβαιότητα της διακύμανσης ανάμεσα στα πειράματα.

Ακολούθως παρέχονται τα αποτελέσματα, και η σχετική βελτίωση μιας παραλλαγής έναντι του άγριου τύπου ως εξής:

30 $IF_x = k_{W_x} / k_x$

όπου το IF σημαίνει Παράγοντας βελτίωσης, το k_{W_x} είναι η σταθερά ταχύτητας διάσπασης του άγριου τύπου (σε δεδομένες συνθήκες) και το k_x είναι η αντίστοιχη σταθερά ταχύτητας της εξεταζόμενης παραλλαγής στο ίδιο πείραμα.

Το IF εκφράζει τη σχετική βελτίωση στο χρόνο ημέρων (το $IF_x = 2$ υποδηλώνει ότι ο χρόνος ημέρων της παραλλαγής x είναι διπλάσιος από αυτόν του άγριου τύπου στο ίδιο πείραμα).

Με βάση μια εκτίμηση των διακυμάνσεων των αντιγράφων σε ένα πείραμα το $IF < 0,7$ ή $IF > 1,3$ θεωρείται σημαντικό.

40 Η μονάδα του k_x είναι $(\text{ημέρα})^{-1}$.

Παραλλαγή	αρ. Πειράματος	πεχά 8	πεχά 8	πεχά 10	
		χωρίς πρωτ. k ^{1) IF²⁾}	+ αλκαλίση k _p IF	χωρίς πρωτ. k _p IF	
5	Άγριος τύπος	3	0,02	0,48	
		5	0,02	0,40	
		6	0,00	0,34	
		7	0,01	0,52	
		8 a	0,01	0,50	
10		b	0,01	0,52	
				0,07	
15	D96N	3	0,00	0,21 2,3	
		5	0,02	0,26 1,6	
15	D111N	3	0,00	0,50 1	
		5	0,02	0,31 1,3	
15	E56Q	3	0,01	0,22 2,2	
	D96L	6	0,01	0,17 2	
		7	0,00	0,23 2,3	
20	R209A/E210A/D96L	7	0,02	0,36 1,4	
	E210Q/D242N/D254N	7	0,02	0,49 1	
				n.d.	

Στο απορρυπαντικό σε πεχά 8 το ¹⁾κ είναι σε όλες τις περιπτώσεις πολύ μικρό, και λόγω του σύντομου χρόνου αποθήκευσης (7 ημέρες, περίπου το 90% της παραμένουσας δριαστικότητας) δεν προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια. Έτσι το IF δεν υπολογίστηκε.

25 Συμπερασματικά ένας αφιμός των ελεγχόντων παραλλαγών έχει βελτιωμένη αντοχή στην πρωτεολυτική αποδόμηση, και σχεδόν όλες είχαν βελτιωμένη αντοχή σε αλκαλικές συνθήκες.

Παράδειγμα 12

Ειδική δραστικότητα

Για τις ακολούθως διακρινόμενες παραλλαγές λιπάσης μετρήθηκε μια μεγαλύτερη ειδική δυαπικότητα (ποσότητες διαστώμενων μορίων υποστρώματος ανά μονάδα χρόνου ανά μονάδα ποσότητας) συγκριτικά με τον άγριο τύπο (wt). Αυτό σημαίνει ότι αυτές οι λιπάσες έχουν μια ανώτερη απόδυση υδρόλυσης του προγραμματικού υποστρώματος.

35 Οι λιπάσες ζυμώθηκαν και καθαριστήκαν με τον ίδιο τρόπο. Οι καθαρισμένες λιπάσες ελέχθηκαν με ένα τυπικό προσδιορισμό LU (Αναλυτική μέθοδος, εσωτερικός αφιμός NOVO NORDISK AF 95/6-GB 1991,02,07). Το δείγμα αναλύθηκε δύο φορές, και οι μέσες τιμές καταχωρίστηκαν σε πίνακα. Η ποσότητα της πρωτεΐνης εκτιμήθηκε με μετρήσεις υπτικής πυκνότητας με φασματοφωτόμετρο Shimadzu, χρησιμοποιώντας μήκος κύματος 280 nm. Το δείγμα θεωρήθηκε καθαρό διαν η αναλογική τιμή των OD280 διευρύνεται δια του OD260 ήταν μεγαλύτερη από 1,6, μαζί με μια μόνη ζώνη ηλεκτροφόρησης πηκτής SDS πολυακρυλιδίου.

40 Hemicola lanuginosa

Ειδική δραστικότητα LU/OD280

D111N	4290*
E56A	4890*
L206V	4750
R209*/E210*	6686
R209A/E210A/D96L	4818
wt	3790

*δοκιμάστηκαν μόνο άπαξ.

ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

(1) ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ:

5 (i) ΚΑΤΑΧΩΡΗΤΗΣ: Novo Nordisk A/S
(ii) ΤΙΤΛΟΣ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ: Παραλλαγές λιπαντησης
(iii) ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ: 2

(iv) ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΑΛΛΗΛΟΓΡΑΦΙΑΣ:

10 (A) ΠΑΡΑΛΗΠΤΗΣ: Novo Nordisk A/S
(B) ΟΔΟΣ: Novo Allc
(C) ΠΟΛΗ: Bagsvaerd
(E) ΧΩΡΑ: Δανία
(F) ΤΑΧ. ΚΩΔΙΚΑΣ: 2880

15 (v) ΑΝΑΓΝΩΣΙΜΗ ΜΟΡΦΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ:
(A) ΤΥΠΟΣ ΜΕΣΟΥ: Δισκέτα floppy
(B) ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗΣ: IBM PC συμβατός
(C) ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ: PC-DOS/MS-DOS
(D) ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ: Patent In Release #1.0, Version #1.25

20 (vi) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΡΕΧΟΥΣΑΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(C) ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ:

25 (vii) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: DK 2196/90
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: 13 ΣΕΠ. 1990

30 (viii) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: DK 2194/90
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: 13 ΣΕΠ. 1990

35 (ix) ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ:
(A) ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: DK 2195/90
(B) ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ: 13 ΣΕΠ. 1990

40 (x) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΥ ΔΙΚΗΓΟΡΟΥ/ΠΡΑΚΤΟΡΑ
(A) ΟΝΟΜΑ: Thalsoe-Madsen, Birgit
(C) ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΗΣ/ΣΥΝΟΨΗΣ: 3520,204-WO

45 (xi) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΤΗΛΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ:
(A) ΤΗΛΕΦΩΝΟ: +45 4444 8888
(B) TELEFAX: +45 4449 3256
(C) TELEX: 37304

290

(2) ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ SEQ ID NO: 2:

(i) ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ:

(A) ΜΗΚΟΣ: 291 αμινοξέα

(B) ΤΥΠΟΣ: αμινοξύ

(D) ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ: γραμμική

(ii) ΤΥΠΟΣ ΜΟΡΙΟΥ: πρωτεΐνη

(xi) ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
20 25 30

Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
35 40 45

Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
50 55 60

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
65 70 75 80

Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
85 90 95

Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
100 105 110

Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
115 120 125

Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
130 135 140

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
145 150 155 160

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
165 170 175

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser

180	185	190
Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr		
195	200	205
Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile		
210	215	220
Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro		
225	230	235
240		
Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp		
245	250	255
Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro		
260	265	270
Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly		
275	280	285
Thr Cys Leu		
290		

EP/15153

ΑΞΙΩΣΕΙΣ

5 1. Μια ενζυματική δραστική λιπάσης από μια γονική λιπάση η οποία γονική λιπάση περιλαμβάνει μια καταλυτική τριάδα δίκτην θρυψίνης περιλαμβάνουσα μια δραστική σερίνη κείμενη σε ένα κιτ' εξυχήν υδρόφροβο, επιμήκη θύλακα σύνδεσης του μορίου της λιπάσης, και περιλαμβάνουσα μια επιφανειακή δομή βρόχου η οποία καλύπτει την ενεργή σερίνη διατηρώντας τη λιπάση βρίσκεται σε αινενεγρή μορφή, η οποία επιφανειακή δομή βρόχου μετατοπίζεται προς έκθεση των καταλοίπων ενεργών κέντρων διατηρώντας τη λιπάση ενεργοποιείται μέσω αυτών δημιουργώντας μια λιπιδική ζώνη επαφής κείμενη στο τμήμα της δομής λιπάσης που περιέχει το ενεργό κατάλοιπο σερίνης που συνίσταται από μια επιφάνεια με αυξημένο επιφανειακό υδρόφροβο χαρακτήρα (υδροφοβία) η οποία αλληλαντιδρά με το λιπιδικό υπόστρωμα στην ή κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης, όπου το ηλεκτροστατικό φορτίο ή/και η υδροφοβία της λιπιδικής ζώνης επαφής έχει μεταβληθεί μέσω εξάλειψης ή αντικατάστασης ενός ή περισσότερων αρνητικά φορτισμένων κατάλοιπων αμινοξέων της λιπιδικής ζώνης επαφής μέσω συδέτερου ή θετικά φορτισμένου κατάλοιπου (-ων) αμινοξέων, ή/και μέσω της αντικατάστασης ενός ή περισσότερων συδέτερων κατάλοιπων αμινοξέων με θετικά φορτισμένο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων, ή/και με εξάλειψη ή αντικατάσταση ενός ή περισσότερων υδρόφιλων κατάλοιπων αμινοξέων με υδρόφροβο κατάλοιπο (-α) αμινοξέων, υπό τον δρό στις η ρηθείσαι παραλλαγή λιπάσης είναι διαφορετική από τις παραλλαγές μιας τέτοιας γονικής λιπάσης αιτιμονότητη από τον *Pseudomonas putida* ATCC 53552, στην οποία το Glu στη θέση 127 έχει αντικατασταθεί με Arg ή/και το κατάλοιπο Phe στη θέση 207 έχει αντικατασταθεί με Thr, Gly, Lys ή Ala.

10 2. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 1, όπου ένα ή περισσότερα κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος ή ασπαρτικού οξέος της ρηθείσαις λιπιδικής ζώνης επαφής έχουν αντικατασταθεί με γλουταμίνη, ασπαραγίνη, αιλανίνη, λευκίνη, βαλίνη, σερίνη, θρεονίνη, λυσίνη ή αργινίνη.

15 3. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 1 ή 2, όπου η γονική λιπάση είναι μια μικροβιακή λιπάση.

20 4. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 3, όπου η γονική λιπάση είναι μια μικητική λιπάση, κατά προτίμηση εξαγόμενη από ένα στέλεχος του *Humicola* ή *Rhizomucor*.

25 5. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 4, όπου η γονική λιπάση είναι μια λιπάση *Rhizomucor miehei*.

30 6. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 5, όπου ένα ή περισσότερα κατάλοιπα αμινοξέα αντικατίστανται ως ακόλουθως:

35 D91N,K,R,A,V,L,S,T·
D256N,K,R,A,V,L,S,T·
D226N,K,R,A,V,L,S,T·
D61N,K,R,A,V,L,S,T·
D113N,K,R,A,V,L,S,T·
E201Q,K,R,A,V,L,S,T· ή
D243N,K,R,A,V,L,S,T.

40 7. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 4, όπου η γονική λιπάση είναι μια λιπάση *Humicola lanuginosa*.

8. Μια παραλλαγή λιπασης σύμφωνα με την αξίωση 7, οπου ένα ή περισσότερα κατάλοιπα εμπνυζέει αντικαθιστανταί ας ακολουθοίς:

5 E87Q,K,R,A,N,T,S,L,V·
D254N,K,R,A,Q,T,S,L,V·
D242N,K,R,A,Q,T,S,L,V·
E210Q,K,R,A,N,T,S,L,V·
E56Q,K,R,A,N,T,S,L,V·
D96N,K,R,A,Q,T,S,L,V·
10 D111N,K,R,A,Q,T,S,L,V·
D62A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
E219A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
E234A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
E57A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
15 E99A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
D27A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
E239A,Q,N,T,S,K,R,L,V·
T267K,R·
20 S85K,R·
T226K,R·
N88K,R·
N92K,R·
I255K,R·
25 I202K,R·
L206K,R·
R209A·
L259K,R·
V203K,R· ή
30 L227K,R· ειδικότερα μια παραλλαγή λιπάσης περιλαμβάνουσα τις ακόλουθες αντικαταστάσεις:

35 E87Q + D254N + D242N + E210Q·
E87Q + D254N + E210Q·
D96N + E87Q + D254N·
R209A + E210A·
R209A + R210A + D96L· ή
E210Q + D242N + D254N

40 9. Μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνα με την αξίωση 3, όπου η γονική λιπάση είναι μια λιπάση ζυμομύκητα, π.χ. εξαγόμενη από ένα στέλεχος *Candida*, ή μια βιακτηριακή λιπάση, π.χ. εξαγόμενη από ένα στέλεχος *Pseudomonas*.

45 10. Μια δομή DNA περιλαμβάνουσα μιας αλληλουχίας DNA κωδικοποιούστη μια παραλλαγή λιπάσης σύμφωνη με οποιοιδήποτε των αξίωσεων 1-9.

11. Ένας ανασυνδυασμένος φορέας έκφρεισης ο οποίος φέρει μια δομή DNA σύμφωνα με την αξίωση 10.

12. Ένα κύτταρο το οποίο μεταμορφώνεται με μια δομή DNA σύμφωνα με την αξίωση 33 ή ένα φορέα σύμφωνα με την αξίωση 11.

5 13. Ένα κύτταρο σύμφωνα με τη αξίωση 12 το οποίο είναι ένα μυκητιακό κύτταρο. π.χ. ανήκον στο γένος *Aspergillus*, δπως *A. niger*, *A. oryzae*, ή *A. nidulans*. ένα κύτταρο ζυμομύκητα. π.χ. ανήκον σε ένα στέλεχος *Saccharomyces*, όπως *S. cerevisiae*, ή ένα μεθυλοτροφικό ζυμομύκητα από το γένος *Hansenula*, δπως *H. polymorpha*, ή *Phichia*, δπως *P. pastoris*. ή ένα βακτηριακό κύτταρο. π.χ. που ανήκει σε ένα στέλεχος *Bacillus*, όπως *B. subtilis*, ή *B. lenthus*.

10 14. Ένα κύτταρο σύμφωνα με την αξίωση 12 το οποίο είναι ένα φυτικό κύτταρο, π.χ. που ανήκει στα *Solanaceae*, δπως *Solanum tuberosum*, ή *Nicotiana tabacum*.

15 15. Μια μέθοδος παραγωγής μιας παραλλαγής λιπάστης σύμφωνα με οποιαδήποτε τιν αξιώσεων 1-9, όπου ένα κύτταρο σύμφωνα με οποιαδήποτε των αξιώσεων 12-14 καλλιεργείται ή ανιπτύσσεται υπό τυνθήκες αγώγυμες στην παραγωγή της παραλλαγής λιπάστης, και επομένως η παραλλαγή λιπάστης ανακτάται από την καλλιέργεια ή το φυτό.

20 16. Ένα απορρυπαντικό πρόσθιτο περιέχον μια παραλλαγή λιπάστης σύμφωνα με οποιαδήποτε από τις αξιώσεις 1-9, κατ' επιλογήν με τη μορφή μη κονιώδους κόκκου, σταθεροποιημένου υγρού ή προστατευμένου ενζύμου.

25 17. Ένα απορρυπαντικό πρόσθιτο σύμφωνα με την αξίωση 16 το οποίο περιλαμβάνει 0,02-200 χλωτγρ. ενζυμικής πρωτεΐνης/γρ. του πρόσθιτου.

18. Ένα απορρυπαντικό πρόσθιτο σύμφωνα με την αξίωση 16 ή 17 το οποίο επιτροποθέτως περιέχει ένα άλλο ενζυμικό δπως μια πρωτεΐνη, αμυλάση, υπεροξειδάση ή/και κυτταφινάση.

30 19. Μια απορρυπαντική σύνθετη περιέχουσα μια παραλλαγή λιπάστης σύμφωνα με οποιαδήποτε των αξιώσεων 1-9.

20. Μια απορρυπαντική σύνθετη σύμφωνα με την αξίωση 19 η οποία επιτροποθέτως περιέχει ένιι άλλο ένζυμο δπως μια πρωτεΐνη, αμυλάση, υπεροξειδάση ή/και κυτταφινάση.

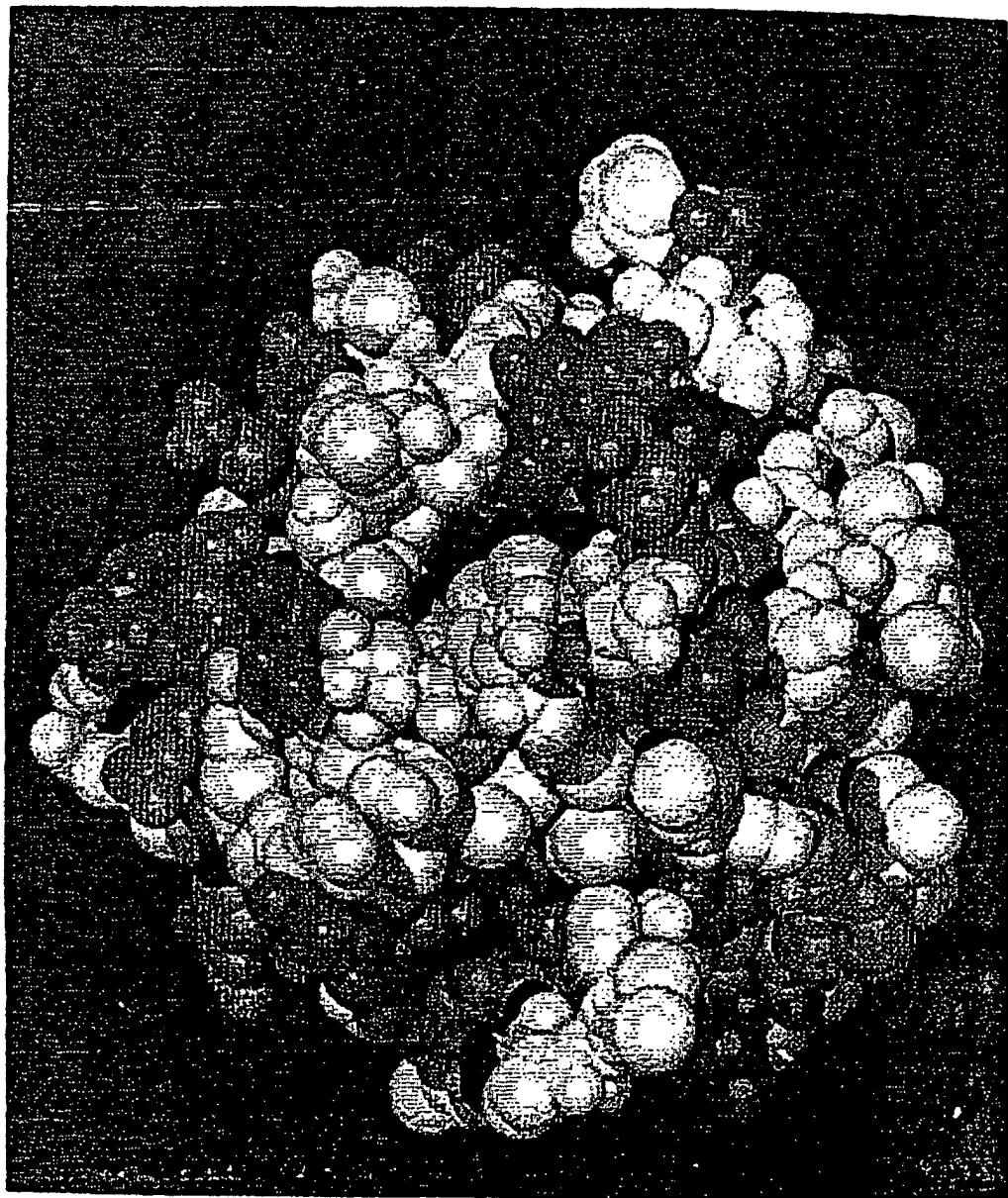
ΤΙΤΛΟΣ

Παραλλαγές λιτάσης

Περιληψη

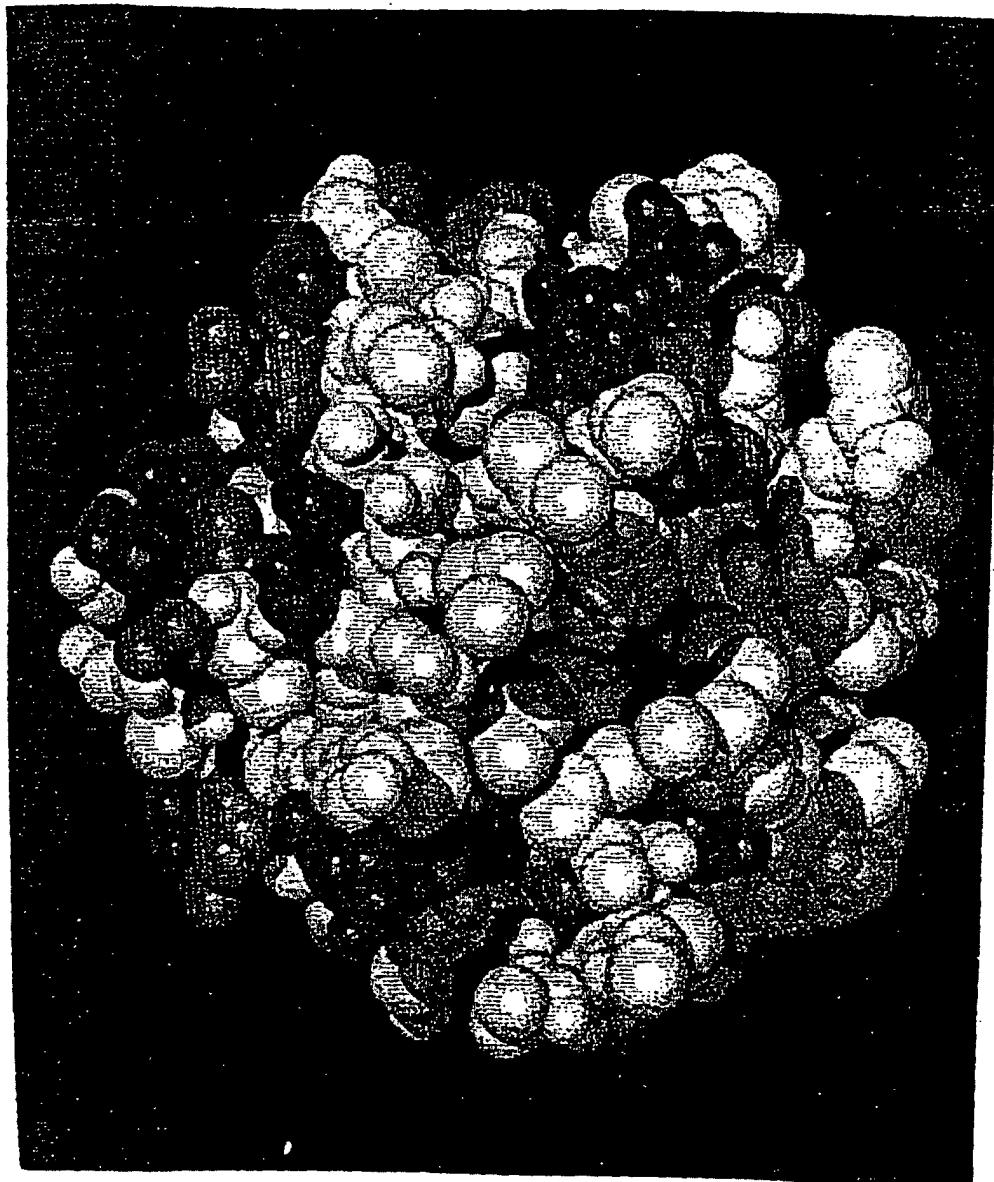
Οι λιπάσες που περιέχουν μια δίκην θρυψίνης καταλυτική τριάδα περιλαμβάνουσα μια ενεργή σερίνη κείμενη σε ένα και' εξοχήν υδρόφοβο, επιμήκη θύλαικα σύνδεσης του μορίου της λιτάσης, ο οποίος θύλαικας απιτελεί μέρος της και περιβάλλεται από μια λιπιδική ζώνη επαφής, μεταλλάσσονται μέσω εξάλειψης ή αντικατάστασης ενός ή περισσότερων καταλοίπων αμινοξέων στη λιπιδική ζώνη επαφής έτσι ώστε να μεταβάλλεται το ηλεκτροστατικό φυστίο ή/και στο υδρόφοβος χαρακτήρας της λιπιδικής ζώνης επαφής, ή έτσι ώστε να μεταβάλλεται η επιφανειακή συμμορφία της λιπιδικής ζώνης επαφής της λιτάσης.

1/9



Ex. 1a

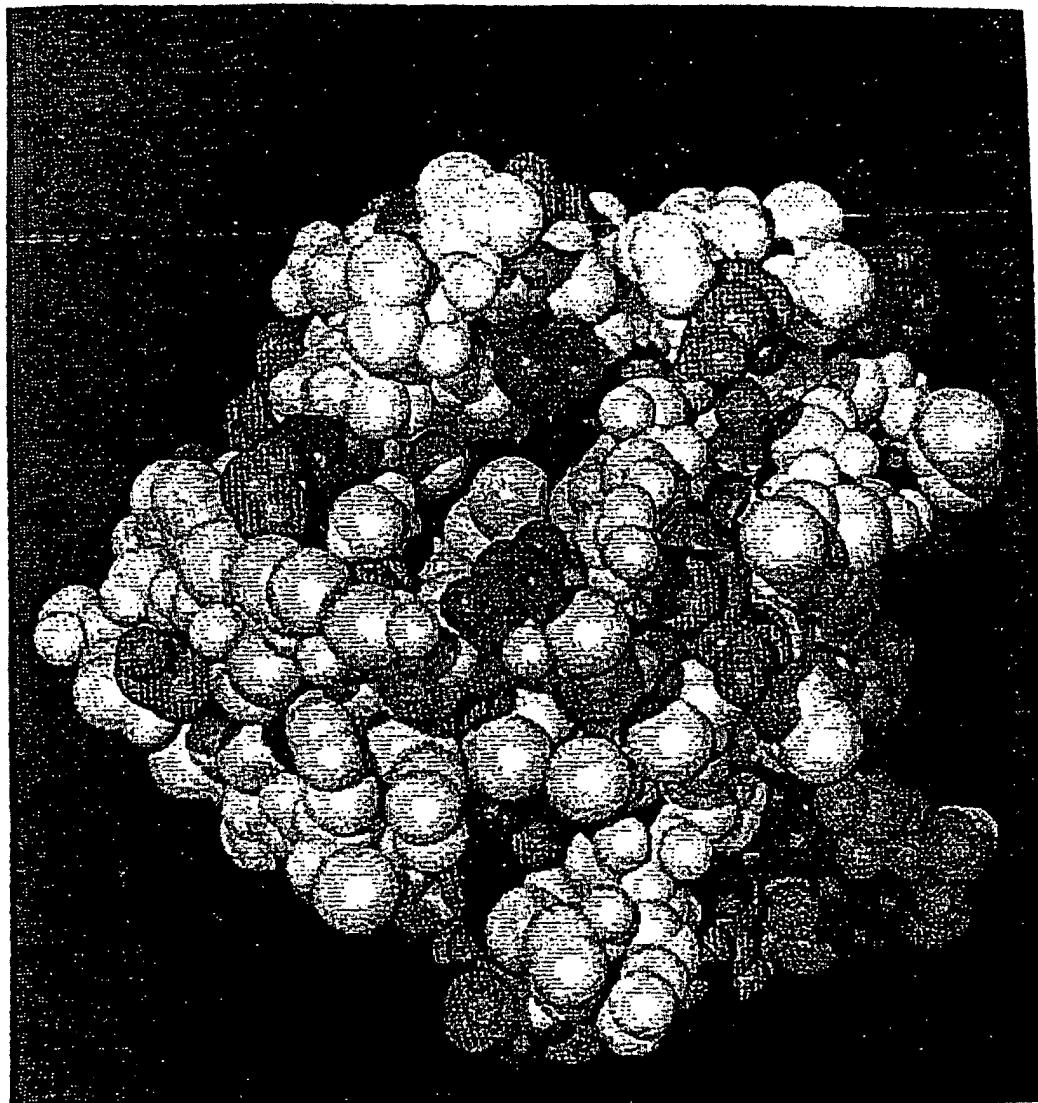
2/9



Ex. 1β

NZAS-0026821

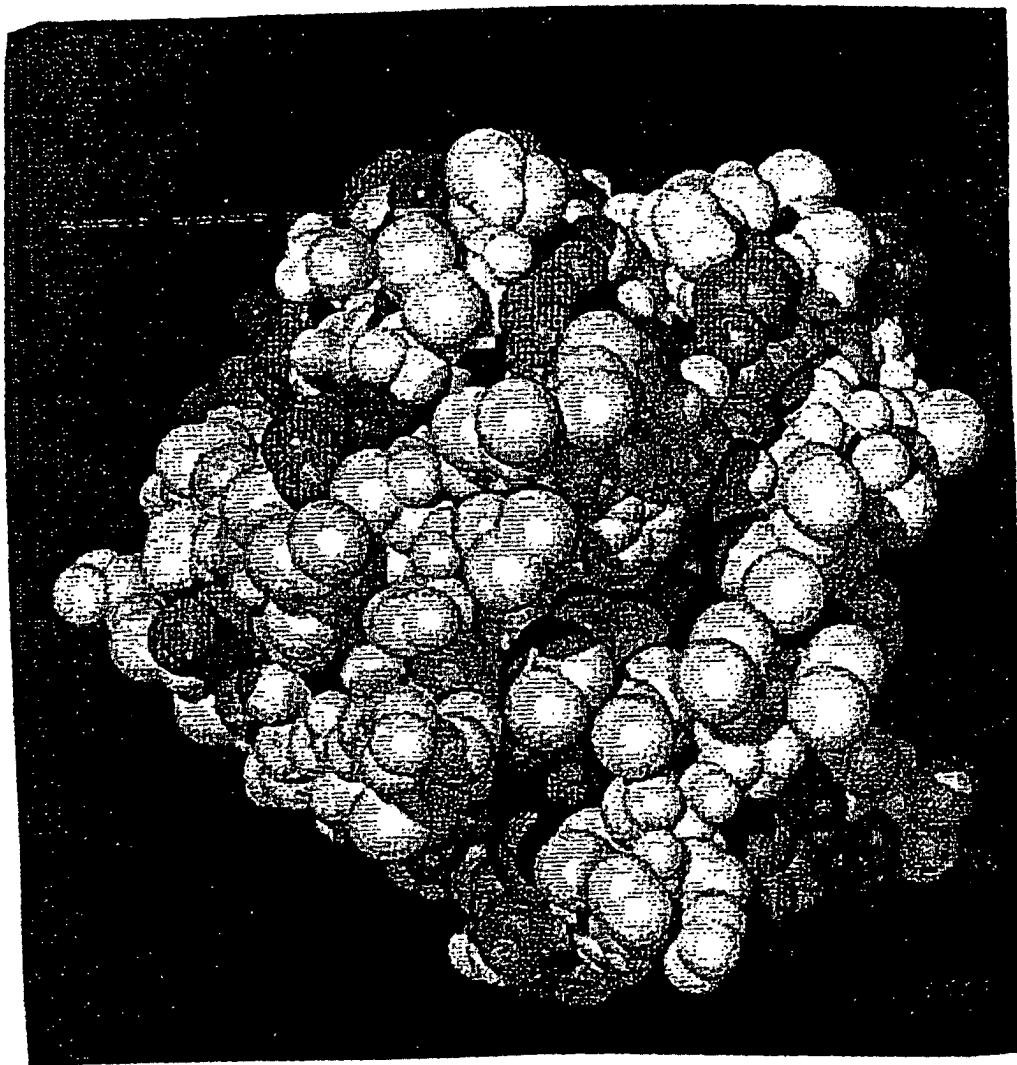
3/9



Ex. 2a

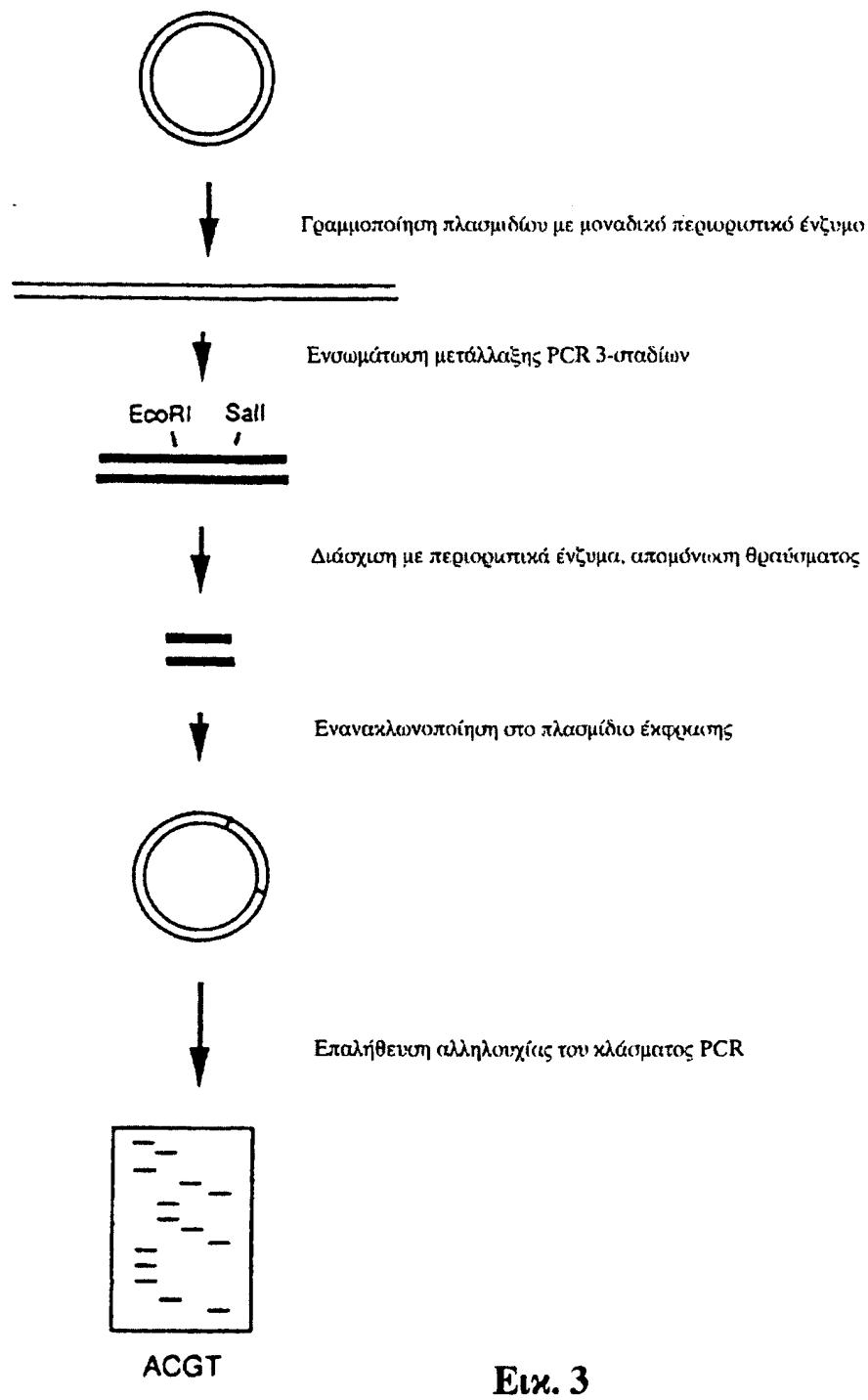
NZAS-0026822

4/9

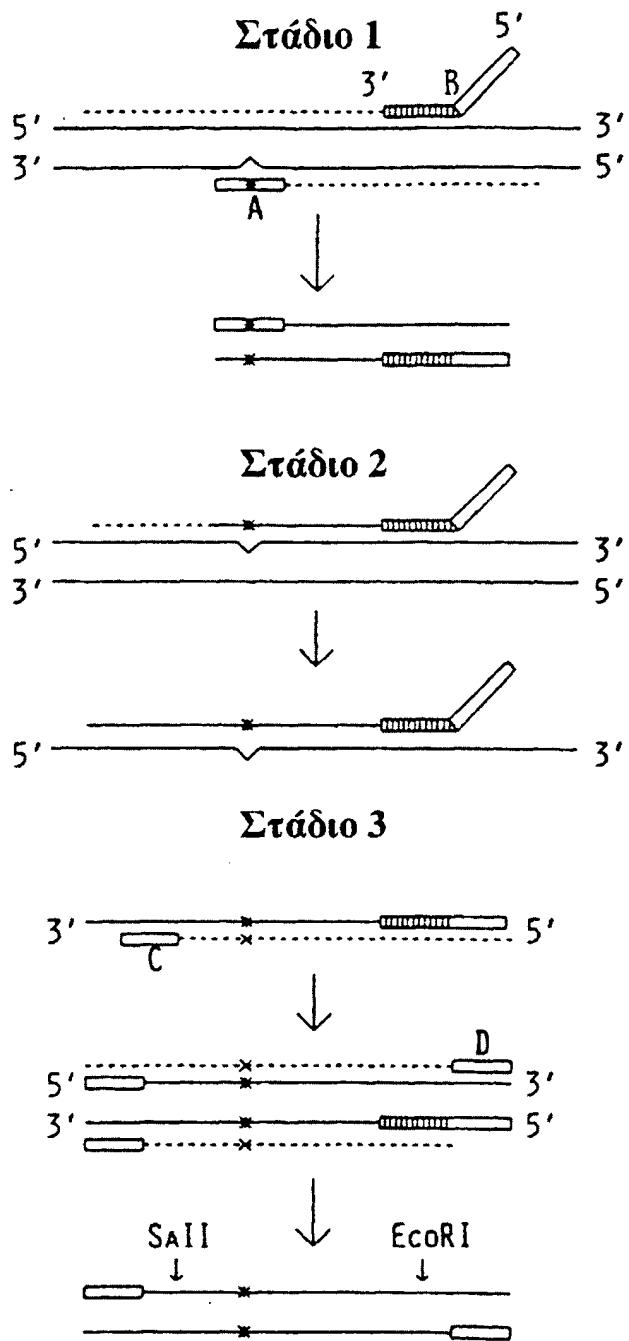


Ex. 2β

NZAS-0026823



6/9



NZAS-0026825

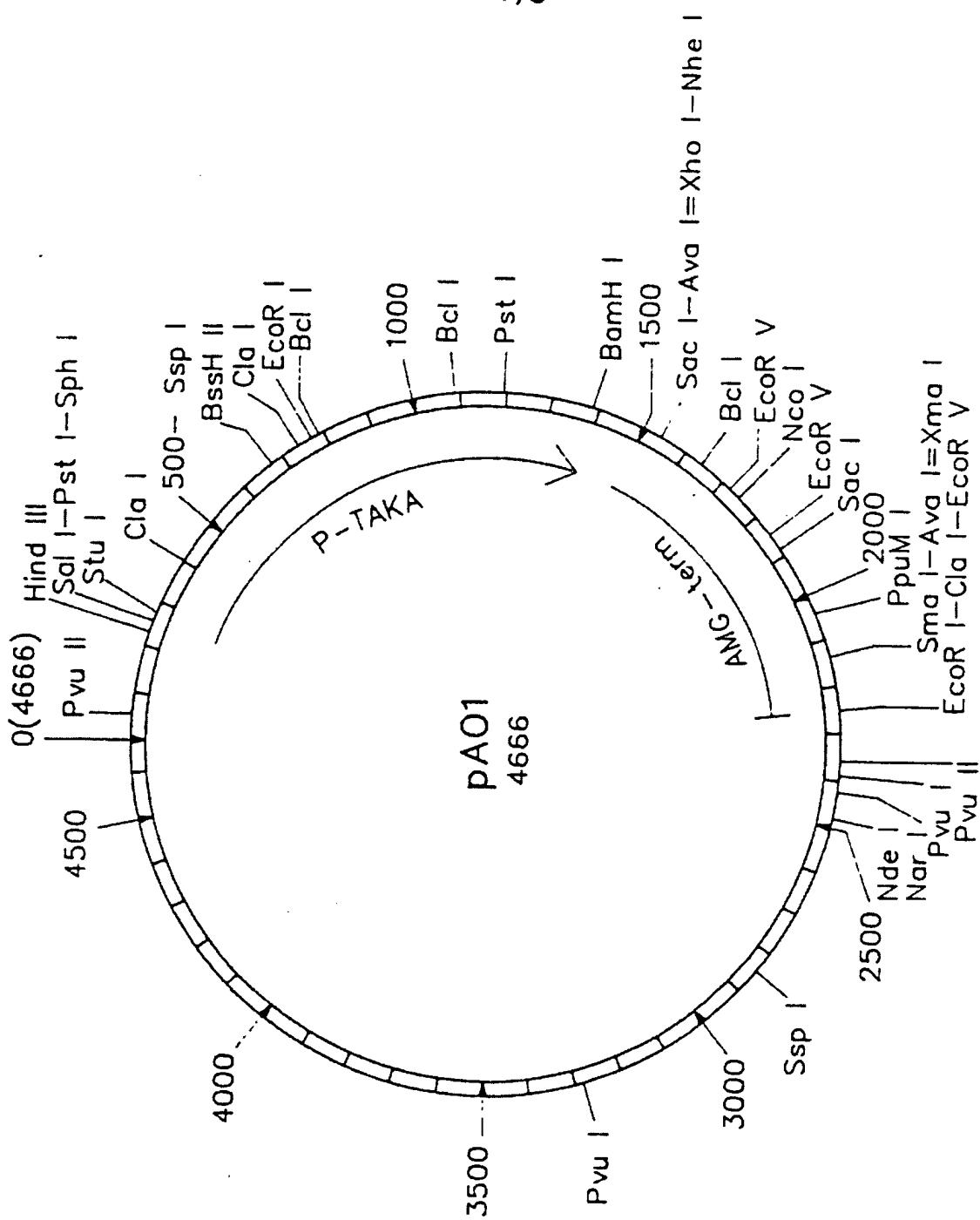
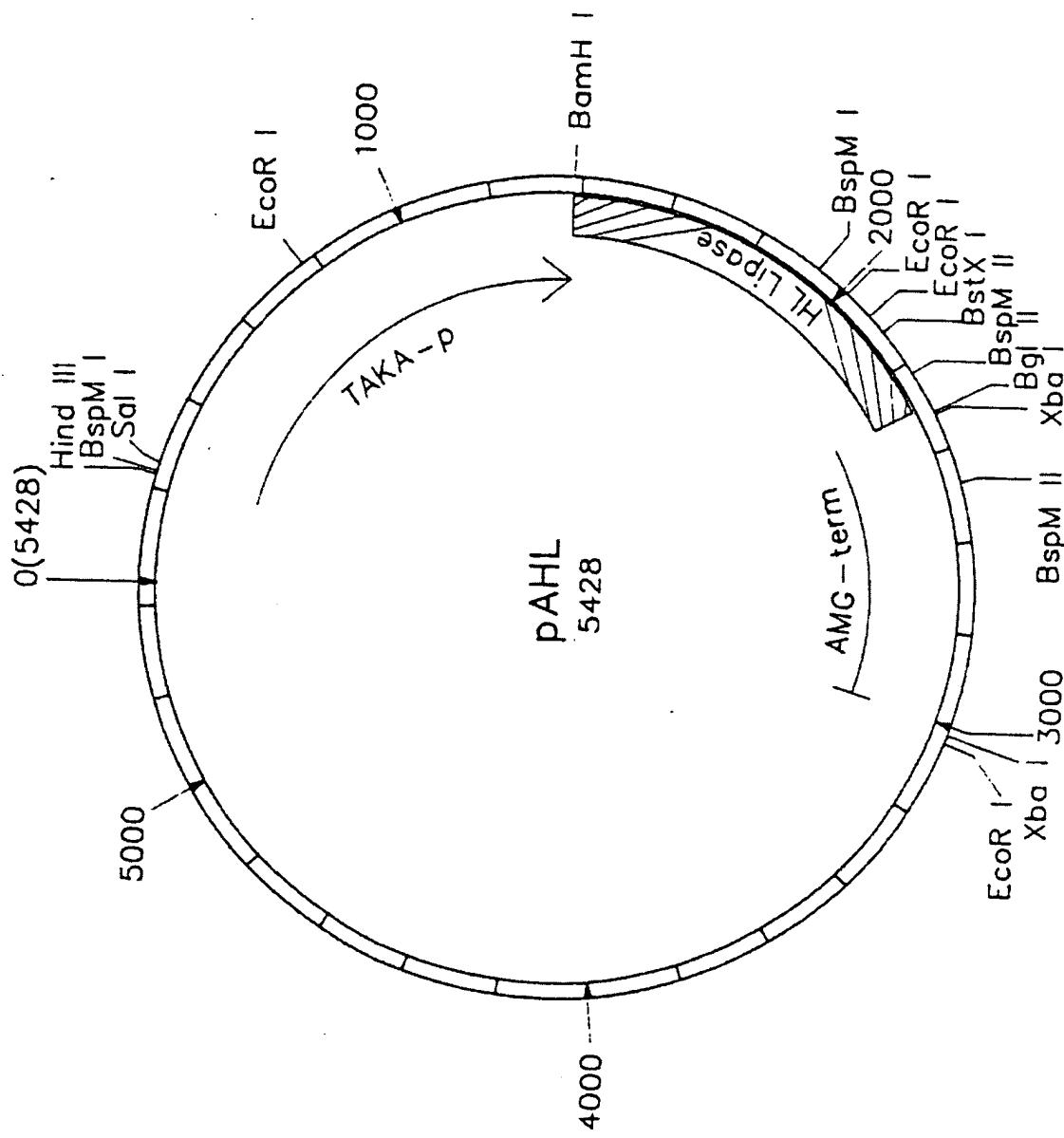


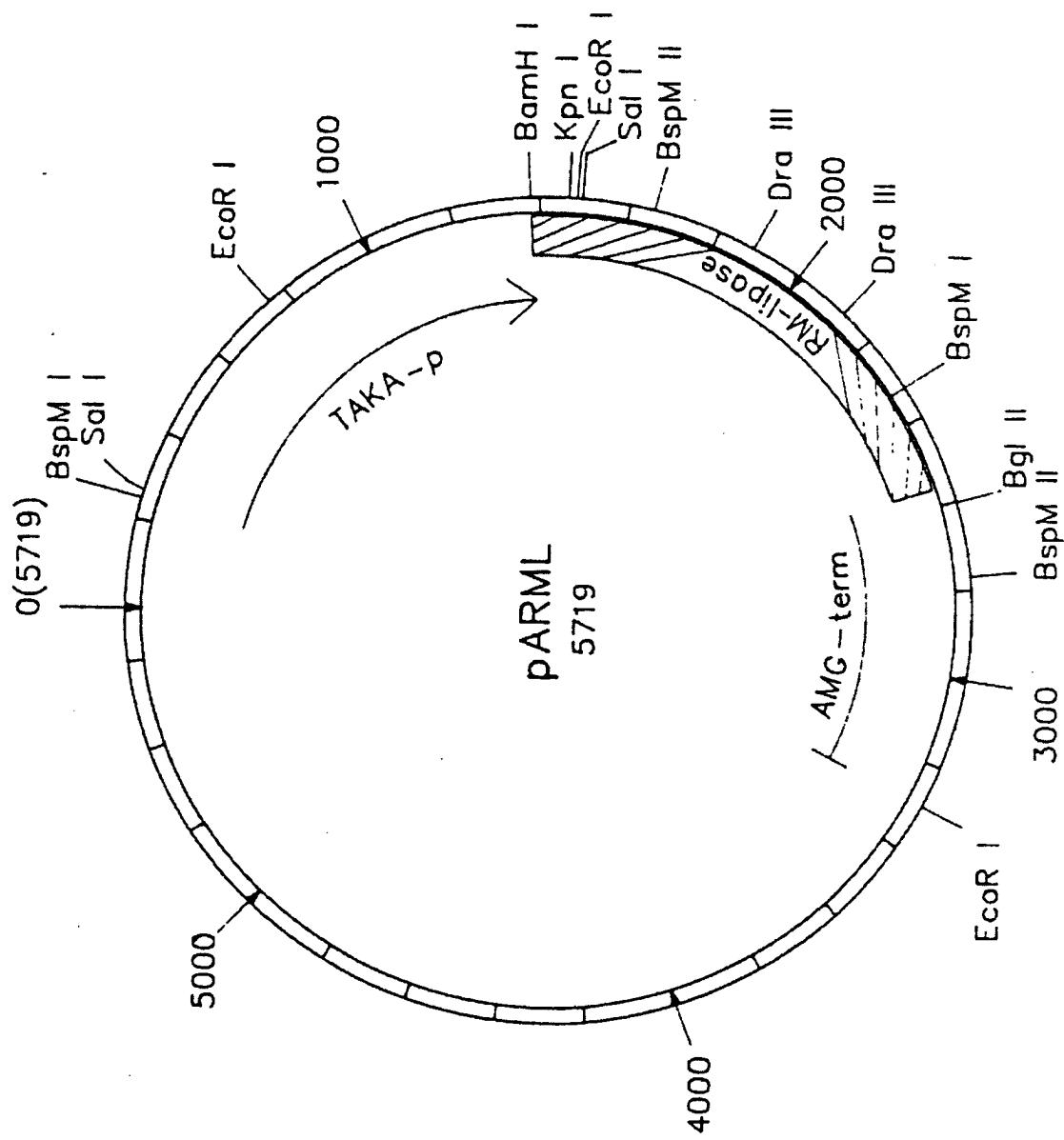
Fig. 5

8/9



Ex. 6

9/9



Ex. 7